

Effekter på insulinsekresjon og endotelfunksjon av Januvia® (DPP- IV hemmer) hos diabetiske nyretransplanterte pasienter

Karen Vik



**Masteroppgave ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt
Det matematisk- naturvitenskaplige fakultet
Universitetet i Oslo
2010**

Veiledere:

**Anders Åsberg, professor cand. pharm
Trond Jenssen, overlege professor dr. med
Anders Hartmann, seksjonsoverlege professor dr. med**

Forord

Nyrefysiologisk laboratorium på Rikshospitalet har vært et svært lærerikt og trivelig sted å utføre masteroppgaven. Det har vært motiverende å jobbe med så mange kunnskapsrike og positive personer. Jeg vil gjerne rette en takk til alle de som har hjulpet meg på veien:

Professor cand. pharm Anders Åsberg for motivasjon, og ustoppelig optimisme i Laser Doppler- opp- og nedturer. Og ikke minst for konstruktiv hjelp i skriveprosessen.

Overlege professor dr. med Trond Jenssen for godt humør og uvurderlig hjelp gjennom hele studien og i skriveprosessen.

Seksjonsoverlege professor dr. med Anders Hartmann som alltid tar seg tid til å svare på spørsmål og komme med nyttige tips.

Bioingeniør Kirsten Lund for praktisk hjelp på pasientdagene. Og hyggelige samtaler om fag, og desto hyggeligere samtaler om det meste annet!

Bioingeniørene Janicke Narverud, Jean Stenstrøm og Els Breistein for tålmodig hjelp og hyggelige lunsjpauser.

Alle pasientene som stilte velvillig opp og gjorde studien mulig å gjennomføre.

Til slutt en spesiell takk til lille Ola, som sparket vilt i magen den første halvdel av studien, og har vært en fantastisk, snill og tålmodig sønn den andre halvdel!

Oslo, 04.01.2010

Karen Vik

Innholdsfortegnelse

Innhold

FORORD	2
INNHALDSFORTEGNELSE.....	3
FORKORTELSER.....	8
SAMMENDRAG	10
1. INTRODUKSJON	11
1.1 NYRETRANSPLANTASJON	11
1.2 DIABETES MELLITUS	12
1.3 POSTTRANSPLANTASJONDIABETES MELLITUS (PTDM).....	13
1.3.1 <i>Definisjon og prevalens</i>	13
1.3.2 <i>Patogenese</i>	14
1.3.3 <i>Risikofaktorer</i>	15
1.3.4 <i>Diabetogene effekter av immunosuppressiva</i>	16
1.3.5 <i>Konsekvenser av diabetes hos nyretransplanterte</i>	17
1.3.6 <i>Behandling av post- transplantasjons diabetes mellitus</i>	17
1.4 ENDOTELFUNKSJON.....	18
1.4.1 <i>Kardiovaskulær risikoprofil hos nyretransplanterte</i>	18
1.4.2 <i>Endotelet</i>	19
1.4.3 <i>Endoteldysfunksjon</i>	19
1.5 SITAGLIPTIN (JANUVIA®)	21
1.5.1 <i>Virkningsmekanisme</i>	21
1.5.2 <i>Biotilgjengelighet og metabolisme</i>	22

1.5.3	<i>Sikkerhetsprofil</i>	22
1.6	STUDIENS HENSIKT	23
2.	MATERIALER OG METODE	25
2.1	STUDIEDESIGN	25
2.2	PASIENTER	28
2.3	BIOKJEMISKE ANALYSER.....	29
2.4	ORAL GLUKOSEBELASTNING	29
2.5	HJEMMEMÅLING AV BLODSUKKER.....	30
2.6	ANALYSE AV NO	30
2.6.1	<i>Bakgrunn for metoden</i>	30
2.6.2	<i>Prøveopparbeidelse</i>	31
2.6.3	<i>Analyse</i>	31
2.6.4	<i>Beregninger</i>	32
2.6.5	<i>Validering av NO- analyse</i>	32
2.7	ANALYSE AV C- PEPTID.....	33
2.7.1	<i>Bakgrunn for metoden</i>	33
2.7.2	<i>Analyse</i>	33
2.7.3	<i>Beregninger</i>	34
2.7.4	<i>Validering</i>	34
2.7.5	<i>C- peptid til glukose, kreatinin ratio (CPGCR)</i>	35
2.8	ANALYSE AV INSULIN	35
2.8.1	<i>Bakgrunn for metoden</i>	35
2.8.2	<i>Analyse</i>	35

2.8.3	<i>Beregninger</i>	36
2.8.4	<i>Validering</i>	36
2.8.5	<i>Insulinsensitivitet</i>	37
2.9	MIKROVASKULÆR ENDOTELFUNKSJON.....	37
2.9.1	<i>Laser Doppler</i>	37
2.9.2	<i>Iontoforese og endotelavhengig vasodilatasjon</i>	38
2.9.3	<i>Postocclusive Reactive Hyperaemia (PORH)</i>	39
2.9.4	<i>Praktisk prosedyre</i>	39
2.9.5	<i>Beregninger</i>	40
2.10	BLODTRYKK.....	42
2.11	URIN.....	42
2.12	COMPLIANCE.....	42
2.13	STATISTIKK.....	42
3.	RESULTATER	43
3.1	PASIENTER.....	43
3.2	BIOKJEMISKE ANALYSER.....	46
3.3	ORAL GLUKOSEBELASTNING.....	48
3.4	ANALYSE AV C- PEPTID OG BEREKNING AV CPGCR.....	52
3.5	ANALYSE AV INSULIN OG BEREKNING AV INSULINSENSITIVITET OG INSULINSEKRESJON.....	52
3.5.1	<i>Insulinsekresjon</i>	52
3.5.2	<i>Insulinsensitivitet</i>	54
3.6	HJEMMEMÅLING AV BLODSUKKER.....	54
3.7	ANALYSE AV NO.....	55

3.8	MIKROVASKULÆR ENDOTELFUNKSJON	55
3.9	URIN	57
3.10	BLODTRYKK.....	57
3.11	COMPLIANCE	57
3.12	BIVIRKNINGER.....	57
4.	DISKUSJON	59
	KILDELISTE	66

Vedlegg

<i>1 Studieprotokoll</i>	<i>75</i>
<i>2 Svar fra Regional komitè for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk</i>	<i>92</i>
<i>3 Svar fra Helsedirektoratet</i>	<i>93</i>
<i>4 Pasientinformasjon</i>	<i>94</i>
<i>5 Skjema for hjemmemåling av blodsukker</i>	<i>98</i>
<i>6 Individuelle data:</i>	
<i>6a: Plasmaglukose fra OGTT</i>	<i>99</i>
<i>6b: Insulinkonsentrasjon fra OGTT</i>	<i>100</i>
<i>6c: C- peptidkonsentrasjon fra OGTT</i>	<i>101</i>
<i>6d: NO- analyse</i>	<i>102</i>
<i>6e: Laser Doppler</i>	<i>103</i>

Forkortelser

ACh	Acetylcholin
ALAT	alanin amino transferase
AU	arbitrære enheter
BMI	body mass index
CPGCR	C- peptide to glucose, creatinine ratio
CRF	clinical research file
CRP	C- reaktivt peptid
CyA	Ciklosporin
ED	endotel dysfunksjon
EDTA	etylendiamintetraeddiksyre
ESRD	end stage renal disease
estGFR	estimert glomerulær filtrasjonsrate
HbA1c	glykosylert hemoglobin
LD	laser doppler
MAP	Mean Arterial Pressure
NO ₂	Nitritt
NO	Nitrogenmonoksid
OGTT	oral glucose tolerance test

OD	optisk tetthet
Peak	maksimal fluksverdi for blodperfusjon
PORH	postokkulsiv reaktiv hyperemi
PTDM	post- transplantasjons diabetes mellitus
Rh	reaktiv hyperemi
tacro	Tacrolimus
tx	transplantasjon/ transplantert

Sammendrag

Post transplantasjons diabetes mellitus (PTDM) defineres som nyoppstått diabetes mellitus etter transplantasjon. PTDM har en lignende patogenese som diabetes mellitus type 2; kombinasjon av relativ insulinmangel og insulinresistens. Antagelig er det mange av de samme risikofaktorene som disponerer for sykdommene. I tillegg til risikofaktorene som disponerer for diabetes også i den generelle befolkningen, gjør kroniske behandling med immunsuppressive legemidler denne pasientgruppen ekstra utsatt for diabetes. Prevalensen av PTDM har de siste årene vært synkende, men er likevel en relativt vanlig komplikasjon etter nyretransplantasjon, og er i seg selv assosiert med høyere dødlighet blant nyretransplanterte.

Studien var en åpen, randomisert, kontrollert, cross- over studie som bestod av to perioder à 4 uker. En periode med sitagliptin- behandling og en periode uten behandling. Sitagliptin er et per oralt antihyperglykemisk middel av typen dipeptidyl-peptidase-4 –hemmer (DPP4- hemmer). Sitagliptin tilhører en ny gruppe av blodsukkersenkede midler, som virker gjennom sin effekt på inkretinsystemet.

Legemiddelets effekt på plasmaglukose, insulinsekresjon og insulinsensitivitet ble undersøkt ved en oral glukose toleranse test ved baseline, etter kontrollperioden og etter perioden med aktiv behandling. Pasienten målte selv blodsukker hver dag i studien. Mikrovaskulær endotelfunksjon ble undersøkt ved hjelp av Laser Doppler kombinert med iontoforetisk administrasjon av ACh (acetylcholin) over huden og postokkulsiv reaktiv hyperemi.

Resultatene viste en signifikant nedgang i plasmaglukose under OGTT, og i hjemmemålingene, etter sitagliptinbehandling. Funnene i denne pilotstudien indikerer at sitagliptin er effektivt og trygt å bruke for nyretransplanterte pasienter med diabetes mellitus, som ikke krever insulinbehandling. Selv om studien ikke finner grunnlag for å tro at sitagliptin påvirker nyrefunksjonen, eller den immunsuppressive behandlingen, er det behov for studier med flere pasienter og lengre varighet.

1. Introduksjon

1.1 Nyretransplantasjon

Når aktiv nyresviktbehandling er nødvendig, er nyretransplantasjon foretrukket fremfor dialyse. Dette forutsetter at pasienten er vurdert til å tåle immunsuppressiv behandling og ellers er egnet for transplantasjon. Transplantasjon gir høyere livskvalitet og er langt mer lønnsomt i et samfunnsøkonomisk perspektiv enn dialyse [1].

Nyretransplantasjon kan utføres med et organ fra avdød (DD) eller levende donor (LD). I Norge er det generell konsensus at andre prioriteres om det finnes en aktuell levende organdonor. Vanligst er en beslektet giver, men også ubeslektede givere (hovedsakelig ektefelle/ samboer) brukes [1]. Av de 250 nyretransplantasjonene som ble utført ved Rikshospitalet i 2007 var 37 % med levende donor [2]. Fordelene ved bruk av LD er flere. Blant annet er ventetiden kortere og dermed øker sjansen for å kunne transplantere predialytisk [1].

Vevsforliklighet mellom donor og resipient må selvsagt vurderes før transplantasjon, da dette er påvirket overlevelsen av transplantatet. ABO- undersøkelse og vevstyping utføres. Aktuelle recepienter som står på venteliste for nyre fra en DD blir ikke kun prioritert etter hvor lenge de har ventet, men også etter forliklighet med organene som doneres. Hovedkriteriet er antall ulikheter i vevstype HLA-DR, som kan være 0, 1 eller 2. Tilbudet går først til den som har 0 uforliklighet i DR. Median ventetid i Norge er 11 måneder [1]. Og per 1.1.2008 stod 206 personer på ventelisten for nyretx [2].

Alle organtransplantasjoner i Norge utføres ved Rikshospitalet. Sykehuset er et av de største transplantasjonssentrene i verden og størst i Europa [1].

For å unngå avstøtning av graftet er nyretransplanterte pasienter avhengig av livslang immunsuppressiv behandling. Monozygote tvillinger er unntaket. Transplanterte < 50 år, mørkhudete eller diabetikere med type 1 diabetes får tacrolimus. Mens nyretransplanterte > 50 år, med BMI (body mass index) > 28, med nedsatt glukose toleranse (IGT) eller pasienter < 50 år som utvikler PTDM, får ciklosporin. I tillegg til en av de nevnte calcineurinhemmerene, består standardregimet av mykofenolsyre og kortikosteroider [3]. Bivirkninger fra denne behandlingen er blant annet nefrotoksisitet på grunn av calcineurinhemmerne og gastrointestinale plager på grunn av mykofenolsyre. Steroidebehandlingen er diabetogen, og i tillegg bidrar den til utvikling av osteoporose, hypertensjon og disponerer for infeksjoner samtidig som den kan maskere dem [1].

1.2 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus er en heterogen gruppe av metabolske sykdommer. Sykdommen karakteriseres av kronisk hyperglykemi som oppstår på grunn av nedsatt insulinsekresjon og/ eller nedsatt insulinsensitivitet. Se tabell 1.1. Sykdommen deles inn i tre hovedtyper; type 1, type 2 og gestational diabetes (svangesskapsdiabetes). Tørste og polyuri er de vanligste symptomene på diabetes og sykdommen har mange negative langtidseffekter. Eksempler er retinopati som kan føre til tap av syn, nefropati som kan gi nyresvikt og neuropati som kan lede til fotsår med eventuell amputasjon. Diabetikere har også økt risiko for kardiovaskulær, perifer vaskulær og cerebrovaskulær sykdom [4].

Verdens helseorganisasjon (WHO) estimerer at mer enn 180 million mennesker i verden har diabetes. Av disse har 90 % type 2 diabetes. De forventer også at antall diabetikere i verden vil fordobles innen 2030. [5]

Tabell 1.1: WHO- og ADAs (American Diabetes Assosiation) diagnostiske kriterier for diabetes.

<u>Diabetes</u>	
Fastende plasmaglukose	$\geq 7.0 \text{ mmol/l}$
	eller
2t plasmaglukose*	$\geq 11.1 \text{ mmol/l}$
<u>Impaired Glucose Tolerance (IGT)</u>	
Fastende plasmaglukose	$\geq 11.1 \text{ mmol/l}$
	og
2t plasmaglukose*	$\geq 7.8 \text{ and } < 11.1 \text{ mmol/l}$
<u>Impaired Fasting Glucose (IFG)</u>	
Fastende plasmaglukose	6.1 to 6.9 mmol/l
	og dersom målt
2t plasmaglukose*	$< 7.8 \text{ mmol/l}$

*Venøst plasma etter standard oral glukosebelastning med 75g glukose.

1.3 Posttransplantasjondiabetes mellitus (PTDM)

1.3.1 Definisjon og prevalens

PTDM har en lignende patogenese som diabetes mellitus type 2; kombinasjon av relativ insulinmangel og insulinresistens [6]. PTDM defineres som nyoppstått DM i

etterkant av transplantasjon, derav det andre navnet som også brukes; New-Onset Diabetes mellitus after transplantation (NODAT). Det finnes ingen egne etablerte kriterier for å diagnostisere PTDM, men det er naturlig å bruke Verdens helseorganisasjons etablerte kriterier for diagnose av diabetes mellitus [7]. Å vurdere nøyaktig prevalens av denne komplikasjonen er umulig, da ulike studier opererer med blant annet ulike diagnostiske kriterier. En review av 19 studier, som til sammen inkluderte 3611 transplanterte pasienter, viste denne spredningen av resultater. Tolv av studiene gjaldt nyretransplantasjon og prevalensen varierte her fra 2 til 50 % [8]. Observasjonstiden i de ulike studiene er svært varierende og er den andre hovedgrunnen til variasjonen. En amerikansk retrospektiv studie viste prevalens av PTDM blant nyretransplanterte på 9,1%, 16% og 24% , ved 3, 12 og 36 måneder etter transplantasjon [9]. Flere studier bekrefter at prevalensen for PTDM øker med antall år etter tx (transplantasjon) [10]. Det ser imidlertid ut til at prevalensen av PTDM generelt er fallende. Risikoen for å utvikle sykdommen har i Norge blitt halvert fra midten av nittitallet og til slutten av 2005. Årsakene til dette kan være lavere steroiddoser, færre avstøtninger (reaksjonbehandling består av høye doser steroider og innebærer dermed også økt risiko for CMV- infeksjon) og at man i 2002 gikk over til forebyggende CMV- infeksjonsbehandling. Erstatningen av azatioprin med mykofenolsyre kan også være av betydning. Mykofenolsyre har bedre immunsupprimerende effekt og gir dermed færre reaksjoner [11].

1.3.2 Patogenese

Om mangel på insulin eller om insulinresistens er den viktigste mekanismen bak PTDM er fremdeles uklart. En studie fra Rikshospitalet, der standard sukkerbelastning ble utført 10 uker og 6 år etter nyretx på 63 pasienter, konkluderes det med at nedsatt insulinsekresjon er hovedmekanismen [12]. På tross av indikasjoner om økt insulinsensitivitet etter nyretransplantasjon, er denne pasientgruppen generelt mer insulinresistente sammenlignet med friske. Studier gjort

på insulinsekresjon hos nyretransplanterte tyder på at insulin mangel, grunnet β -celle dysfunksjon, er minst like viktig [13].

1.3.3 Risikofaktorer

Alder er en definitivt en risiko faktor for PTDM, dette bekreftes i mange studier [8] [14] [9] [15] [10]. En annen kjent risikofaktor er cytomegalovirusinfeksjon (CMV infeksjon). Både asymptomatisk CMV- infeksjon og CMV- infeksjon som gir sykdom, er uavhengige risikofaktorer for PTDM. Det ser ut til at det er nedsatt insulinsekresjon som er dominerende hos disse personene med diabetes. Årsaken kan være destruksjon eller nedsatt funksjon av β -celler på grunn av proinflammatoriske cytokiner som dannes under infeksjonen [16] [17]. Mange studier beskriver også en sammenheng mellom PTDM og HCV (hepatitt C virus) seropositiv status [15]. Dette bekreftes i en metaanalyse som tok for seg ti kliniske studier som viste statistisk en signifikant sammenheng [18].

Andre kjente risikofaktorer er hypertensjon før transplantasjon og svart rase [15]. En tidligere studie fra OUS Rikshospitalet viste at nyretransplanterte som utviklet PTDM oftest hadde diabetes blant førsteleddsslektninger. Og at det i denne gruppen var høyest frekvens av DR- mismatched grafts, HLA- B26 phenotype og CMV infeksjoner [14]. Signifikant sammenheng mellom forhøyet BMI og PTDM er vist i en del studier [10], men ikke i alle [14].

Det spekuleres også i om polymorfisme i gener som disponerer for type 2- diabetes også kan være markører for PTDM. Dette hevdes blant annet i en studie der 1076 nyretx pasienter fra ulike senter i Belgia og Frankrike ble genotypet. Pasientene hadde ikke diabetes før transplantasjon og det var en signifikant sammenheng mellom NODAT og TCF7L2 (rs7903146) polymorfisme ($p = .002$) (TCF7L2 står for transcription factor 7 like 2. Den er uttrykt på β -celler og er involvert i insulinsekresjon) [19].

En nylig publisert belgisk studie foreslår at magnesiummangel alene er en risikofaktor for PTDM [20].

1.3.4 Diabetogene effekter av immunosuppressiva

De ulike immunsupprimerende legemidlene som brukes for å forhindre graftreksjon har i ulik grad effekt på glukosemetabolismen. Av kalsienurinhemmerene er tacrolimus assosiert med størst negativ effekt på glukoseomsetningen. Dette bekreftes i mange studie blant annet den internasjonale, randomiserte DIRECT- studien [21]. Den nøyaktige mekanismen for de diabetogene effektene av kalsineurinhemmerene er ikke fullstendig klarlagt. Ut i fra *in vivo* og *in vitro* studier ser det ut til at effekten først og fremst skyldes reversibel β - celle toksisitet som påvirker både produksjonen og sekresjonen av insulin. CyA (ciklosporin) gir antakelig også en viss grad av perifer insulinresistens. Tacrolimus virker sannsynligvis på samme måte, men har i større grad en CsA, påvirkning på insulinsekresjonen [22]. Mykofenolat ser ikke ut til å ha noen diabetogen effekt [9]. Sirolimus innehar antagelig også en diabetogen effekt, men ikke i like stor grad som tacrolimus. Mekanismen er uklar men det er foreslått at denne kan potensere tacrolimus' β - celle toksisitet [22-25]. I 2007 ble basiliximab introdusert som induksjonsterapi etter nyretransplantasjon. Funnene fra en retrospektiv studie antyder en negativ effekt av basiliximab på glukose homeostasen hos nyretransplanterte pasienter. Mekanismen er foreløpig ukjent [26].

Prednisolons diabetogene effekt har lenge vært kjent. Mekanismen bak kortikosteroidenes diabetogene effekt er insulinresistens etterfulgt av økt glukoneogenese i lever og nedsatt glukoseopptak og glykogensyntese i skjelettmuskelceller. Steroidene vil også indirekte kunne gi insulinresistens gjennom bivirkninger som vektøkning [27, 28]. Hjelmæsæth et. al dokumenterte en klar sammenheng mellom prednisolondosen og glukoseintoleranse. Høyere daglig dose prednisolon viste seg alene å være negativt korrelert til glukosetoleranse hos nyretransplanterte. Risikoen for å utvikle PTDM var 5 % per 0,01 mg/kg/dag [14]. En

reduksjon fra en relativ høy daglig prednisolondose (10- 30 mg) kort tid etter transplantasjon, til en lav/ middels dose (5- 12,5 mg) innen det første året, har en fordelaktig virkning på glukosetoleransen. Den samme studien som viste dette, fant ikke bevis for at seponering av prednisolon etter lavdosebehandling gav økt insulineffekt. Disse funnene støtter tidligere publiserte resultater fra en studie ved samme sykehus [29]. En nylig publisert studie fra OUS Rikshospitalet forslår at mengden ubundet serum prednisolon er viktigere enn prednisolon dosen per se. Studien viste en lineær sammenheng mellom ubundet serum prednisolon og plasmaglukose (2- timers verdi etter OGTT)[30].

1.3.5 Konsekvenser av diabetes hos nyretransplanterte

En begrensning ved de fleste studier gjort på PTDM er at follow-up- periodene er korte i forhold til tiden for utvikling av diabeteskomplikasjoner. Men enkelte, små studier antyder at PTDM er assosiert med økt forekomst av komplikasjoner som for eksempel; diabetes nefropati, hypertensjon, dyslipidemi og andre symptomer på hjerte- karsykdommer. Økt risiko for infeksjoner er også sett hos transplanterte med diabetes [31]. Hjelmæsæth et. al viste i 2006 at diagnostisering av PTDM innen de 3 første månedene etter transplantasjon, trolig er en prediktor på MCE (Major Cardiovascular Events). I denne prospektive studien ble pasientene fulgt i 7- 9år [32]. PTDM er i tillegg til å være assosiert med en mer ufordelaktig kardiovaskulær risikoprofil, også i seg selv assosiert med høyere dødelighet hos nyretransplanterte [33].

1.3.6 Behandling av post- transplantasjons diabetes mellitus

Generelle retningslinjer for medikamentell behandling av DM2 anbefaler biguanidderivatet metformin som førstevalg [34]. I følge tall fra reseptregisteret.no for 2008, var metformin det legemiddelet 84,1 % av de som stod på et peroralt antidiabetika brukte [35]. Dette preparatet gir god blodsukkersenkende effekt og ingen vektøkning, heller en svak vektnedgang hos en del pasienter [36]. Metformin

utskilles ved glomerulær filtrering og tubulær sekresjon. Nedsatt nyrefunksjon fører til redusert renal clearance og gir dermed økte metforminnivåer i plasma.

Legemiddelet er kontraindisert ved nyresvikt eller nedsatt nyrefunksjon (kreatininclearance <60 ml/min). Årsaken er risikoen for stoffskiftekomplikasjonen melkesyreacidose. Tilstanden karakteriseres ved acidosefremkalt dyspné, magesmerter og hypotermi etterfulgt av koma, og gir høy dødlighet uten rask behandling [37]. Det har blitt innrapportert 37 tilfeller av melkesyreacidose hos metforminbrukere til legemiddelverket i perioden 1984- 1. juli 2009. 19 av disse pasientene hadde nyresvikt og av dem var det 7 som døde [38].

Nyretransplanterte pasienter med DM2 eller PTDM skal altså ikke behandles med metformin. Der livsstilsendring og/ eller dosereduksjon av prednisolon ikke er nok for å oppnå et tilfredsstillende blodsukker nivå, er monoterapi med glipizid i dag førstevalget. Glipizid kan også kombineres med NPH insulin. Rosiglitason, et annet peroralt antidiabetika, er trolig også trygt og effektivt for denne pasientgruppen, men man har foreløpig liten erfaring med dette [39].

1.4 Endotelfunksjon

Risikoen for kardiovaskulære sykdommer er dobbelt så stor hos nyretransplanterte, sammenlignet med den generelle befolkningen, og er den største dødsårsaken i denne pasientgruppen. Diabetes forverrer situasjonen ytterligere. Nedsatt funksjon i endotelet gir nedsatt vasodilaterende evne og kalles endoteldysfunksjon.

Endoteldysfunksjon er et forstadie til aterosklerose og er også assosiert med mange andre vaskulære sykdommer. Endotel dysfunksjon sees ofte hos nyretransplanterte og diabetikere. Mål av endotelfunksjon kan gi tidlig tegn på vaskulære komplikasjoner.

1.4.1 Kardiovaskulær risikoprofil hos nyretransplanterte

Nyretransplanterte har dobbelt så stor risiko for å få, og dø av, hjerte- kar- komplikasjoner, sammenlignet med befolkningen generelt. Mange nyretransplanterte

dør med velfungerende transplantat av slike årsaker [40]. En 30 år gammel nyretransplantert har omtrent samme risiko hjerte-kar sykdom som en 70 åring [41]. Årsakene som bidrar til dette kan deles i tre hovedkategorier. Den første er de tradisjonelle risikofaktorerne for CVD (cardio vascular disease) som gjelder hele befolkningen; økende alder, kjønn, CVD i familien, røyking og hypertensjon. Den andre kategorien er risikoene som følger av å ha nedsatt nyrefunksjon. Det kan være tilbakefall av sykdommen som førte til behov for nyretx. Eller tilstander som kommer av nyredysfunksjon, for eksempel anemi og hypertensjon. Den siste kategorien er kardiovaskulære risikofaktorer direkte knyttet til transplantasjonen. Disse er akutte reaksjoner og steroidbehandlingen av disse, virusinfeksjoner, og ikke minst, kronisk immunsuppressiv behandling [42, 43].

1.4.2 Endotelet

Endotelet er ikke bare en fysisk barriere mellom blodet og åreveggen, det er også et endokrint- og parakrint organ i seg selv. Det frigjør en rekke dilaterende og konstringerende substanser og er dermed svært viktig for opprettholdelsen av den vaskulære homeostasen. De endotelderiverte vasodilatorene er prostasyklin, bradykinin, en ukarakterisert hyperpolariseringsfaktor og NO (nitrogenoksid). Den viktigste av dem er NO, tidligere kjent som EDRF, endotel-derivert relakserende faktor. Bradykinin stimulerer frigjøring av de andre vasodilatorene. Dessuten stimulerer den produksjon av vevsplasminogenaktivator, og kan derfor være viktig i fibrinolysen. Prostasyklin virker i synergi med NO for å hemme plateaggregering. De endotelderiverte vasokonstriktorene er endotelin, som er den mest potente, reaktive reactive oksygen- species (ROS), prostaglandin H₂ (PGH₂), tromboxane (TXA₂) og angiotensin II [44].

1.4.3 Endoteldysfunksjon

Begrepet endoteldysfunksjon omfatter flere patologiske tilstander. Men i litteraturen brukes begrepet oftest for å beskrive nedsatt biotilgjengelighet av endotelderiverte

vasodilaterende faktorer, som fører til nedsatt vasodilaterende evne. Dette oppstår på grunn av en ubalanse mellom de vasoaktive substansene som sekreseres her. Skader på endotelet og endotel dysfunksjon er et sentralt fenomen ved med mange vaskulære sykdommer [44]. ED (endotel dysfunksjon) er en vanlig tilstand hos både nyretransplanterte og diabetikere [45]. Hos diabetikere kan både hyperglykemi, dyslipidemi, økte nivåer av frie fettsyrer og inflammasjon bidra. Hyperglykemi kan påvirke det vaskulære vevet på mange måter. Blant annet ved økt oksidativt stress, økt cytokinproduksjon og protein kinase C aktivering. Insulinresistens antas også være med og forklare ED hos diabetikere. Insulin stimulerer frigjøring av både NO og vasokonstriktoren endotelin-1 fra endotelcellene. Stimuleringen av NO frigjøring skjer blant annet via PI3K- akt aksen, og denne signalveien er antagelig nedsatt ved insulinresistens. I tillegg følges insulin resistens normalt av hyperinsulinemi, fordi kroppen prøver å kompensere for insulinets manglende effekt. Samlet vil dette kunne gi nedsatt NO- produksjon og økt ET-1 sekresjon. [44]. Men om insulinresistens er en uavhengig faktor for utvikling av ED er ikke avklart og det er behov for store prospektive studier [46].

Som nevnt, er immunsuppressiv behandling en risikofaktor for endoteldysfunksjon. Cyklosporinindusert hypertensjon innebærer økt systemisk vaskulær motstand og mange mekanismer er foreslått; natriumretensjon, økte endotelin nivå i blodet, forandringer i prostasyklinproduksjon og økt aktivering av sympatikus. Siden har det blitt økt fokus på L- arginin/ nitrogen oksid- systemet. Flere studier støtter dette, blant annet to som henholdsvis viser nedsatt basal og stimulert NO- produksjon hos nyretransplanterte pasienter behandlet med CyA [47]. En studie har i midlertid vist en akutt forhøyet mikrovaskulær reaktivitet ved Laser Doppler flowmetri kombinert med PORH (postokkulsiv reaktiv hyperemi) etter administrering av CyA. Det kan muligens skyldes lokalt forsøk på kompensasjon i form av økt aktivitet i et eller flere vasodilaterende systemer [48].

1.5 Sitagliptin (Januvia®)

Sitagliptin er legemiddelet som ble utprøvet i studien. Preparatet er et per oralt antihyperglykemisk middel av typen dipeptidyl- peptidase-4 –hemmer (DPP4-hemmer). Sitagliptin tilhører en ny gruppe av blodsukkersenkede midler, som virker gjennom sin effekt på inkretinsystemet.

1.5.1 Virkningsmekanisme

Sitagliptin((2R)-4-oxo-4-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro[1,2,4]triazolo[4,3-]pyrazin-7(8 H)-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-2-amine) utøver sin blodsukkersenkende effekt ved å hemme enzymet DPP-4. Dette enzymet hydrolyserer inkretinhormoner, der de to viktigste er GLP- 1 og GIP. Begge hører til glukagon- peptid- familien. GIP (et 42- aminosyrepeptid) utskilles som respons på oralt fett- og karbohydratinntak, fra K- celler, som først og fremst er lokalisert i duodendum og proximale jejunum. GLP- 1(et 30- aminosyrepeptid eller 31- aminosyrepeptid), er et produkt av proglukagon og skilles hovedsakelig ut av L- celler i ileum og colon. Men GLP- 1 finnes også i alpha-celler i pankreas og i neuroner i hjernen. Selv om L- cellene først og fremst sitter i den diastale delen av tarmen, frigjøres GLP- 1 raskt etter matinntak. Det antas derfor at frigjøringen kontrolleres av endokrine og neurale mekanismer som i gangsettes som respons på matinntak. Fastende nivåer i blodet av disse inkretinene er lave [49].

Inkretin effekten er den postprandiale økningen av insulinsekresjon som kan tilskrives gastrointestinale hormoner. Denne effekten utgjør 50-70 % av den totale insulinresponsen etter et måltid [49]. GLP-1 og GIP stimulerer glukoseavhengig insulinsekresjon ved aktivering av G- protein- koblete reseptorer (GLP-1R og GIPR) på β - celler i pankreas. Den nøyaktige mekanismen for hvordan disse inkretinene kun stimulerer insulinsekresjon ved hyperglykemi er uklar. Men man vet at både GLP- 1 og GIP gir økt cAMP og aktivering av protein kinase A [50, 51]. Inkretinresponsen er redusert ved type-2 diabetes, og det er som regel GLP-1 aksene som er redusert, ikke GIP [52]. Om inkretinresponsen er nedsatt ved PTDM er ukjent.

GLP- 1 og GIP har kort halveringstid da de raskt blir hydrolysert av DPP- IV. Ved inhibering av dette enzymet får man en forlengelse av inkretineffekten. Sitagliptin fører til nedsatt DPP- IV aktivitet, økte postprandiale GLP- 1 konsentrasjoner og nedsatt plasmaglukose. Sammenlignet med placebo gir sitagliptin en fordobling i postprandialt GLP- 1 nivå [53] Legemiddelet doseres en gang daglig (steady state oppnås etter 2-3 dager), og anbefalt dagsdose gir DPP- IV hemming (>80 %) i 24 timer[54]. Det er også sannsynlig at sitagliptin kan forbedre β - cellefunksjonen. En økning i HOMA- β (homeostasemodell for bestemmelse av β - celle funksjon) på opp mot 20 % (range 12,9 % - 19,5 %) ble sett i 24- ukers placebokontrollert studie [55].

DPP- 4 hører til en familie av serin peptidaser, som også inkluderer DPP- 8 og DPP- 9. Sitagliptin har høy grad av selektivitet for DPP- IV, minst 2600 ganger høyere selektivitet for DPP- IV enn DPP- 8 og DPP- 9 [54] Dette synes å være viktig, da prekliniske studier viser at hemming av DPP- 8/9 assosieres med multiorgantoksisitet [56].

1.5.2 Biotilgjengelighet og metabolisme

Oral biotilgjengelighet av 100 mg sitagliptin er 87 % og påvirkes ikke av matinntak [53]. Da andelen som skilles ut i urin ikke synes å være doseavhengig [57], antar man at resultatene for matinntak også kan ekstrapoleres til andre dagsdoser, for eksempel 25 mg og 50 mg. Sitagliptin fjernes først og fremst fra kroppen gjennom renal eliminasjon. Nyre- clearance står for ca. 69 % av total plasma- clearance av legemiddelet [53]. Plasma sitagliptin AUC_{0-...} øker proporsjonalt med dosen (vist ved doser fra 1,5 til 600 mg). Halveringstiden for legemiddelet er mellom 8 og 14 timer. Median t_{max} verdier varierer fra 1-6 timer. Og det kan se ut til at t_{max} blir kortere ved økende sitagliptin- dose [54].

1.5.3 Sikkerhetsprofil

Sitagliptin er generelt godt tolerert [54, 55]. De hyppigste bivirkningene rapportert i kliniske studier er av gastrointestinal karakter. Som magesmerter, kvalme og diarè.

Andre bivirkninger som har vært registrert er infeksjoner i nese og svelg, ryggsmertor, osteoartritt og smerter i ekstremitetene [58]. Sitagliptin blir i liten grad metabolisert av leverenzymor og det er antakelig årsaken til at ingen klinisk relevante legemiddelinteraksjoner er oppdagat. Studior er utført for å kartlegge mulige interaksjoner mellom sitagliptin og simvastatin, glyburid, warfarin eller rosiglitazon. Studiene konkluderer med at sitagliptin ikke påvirker farmakokinetikken til disse legemidlene [59-62].

Sitagliptin er etter det vi kjenner til ikke hittil utprøvet på nyretransplanterte. Men flere studior er utført på pasienter med varierende grad av nyresvikt. En studie utført av produsenten av Januvia® (sitagliptin), Merck Sharp & Dohme, konkluderer med at dosejustering av legemiddelet er trygt ved moderat og alvorlig nyresvikt. Slik oppnås plasmakonsentrasjoner av sitagliptin som er sammenlignbare med dem man finner hos nyrefriske pasienter ved normal dosering. Ingen doseendring er nødvendig ved kreatinin clearance 50–80 ml/min. Når kreatinin clearance er 30–50 ml/min bør den normale dosen på 100 mg per dag halveres til 50 mg per dag. Ved alvorlig nyresvikt hvor kreatinin clearance er <30 ml/min eller ESRD (end stage renal disease) foreslås 25 mg/dag [63]. En større, placebokontrollert studie, visste også at sitagliptin ble godt tolerert av pasienter med varierende grad av nyresvikt. Det ble i denne studien også korrigert for nedsatt nyrefunksjon ved doseendringer som foreslått over [64]. I en liten studie (n=8) ble det studert om CyA innvirker på sitagliptins farmakokinetikk. Studien viste at coadministrering av CyA ikke hadde noe effekt på nyre clearance, $t_{1/2}$ eller C_{24t} for sitagliptin [65].

1.6 Studiens hensikt

Studios overordnede hensikt var å undersøke effekt og sikkerhet ved bruk av Januvia® (sitagliptin) hos nyretransplanterte pasienter med glukoseintoleranse eller diabetes. Enten alene eller som tillegg til til annen behandling. Effekt på

Introduksjon

plasmaglukose, insulinsekresjon og endotelfunksjon ble undersøkt. Sikkerheten ble vurdert med hensyn på både bivirkninger og eventuelle interaksjoner med pasientenes immunsuppressive behandling.

2. Materialer og metode

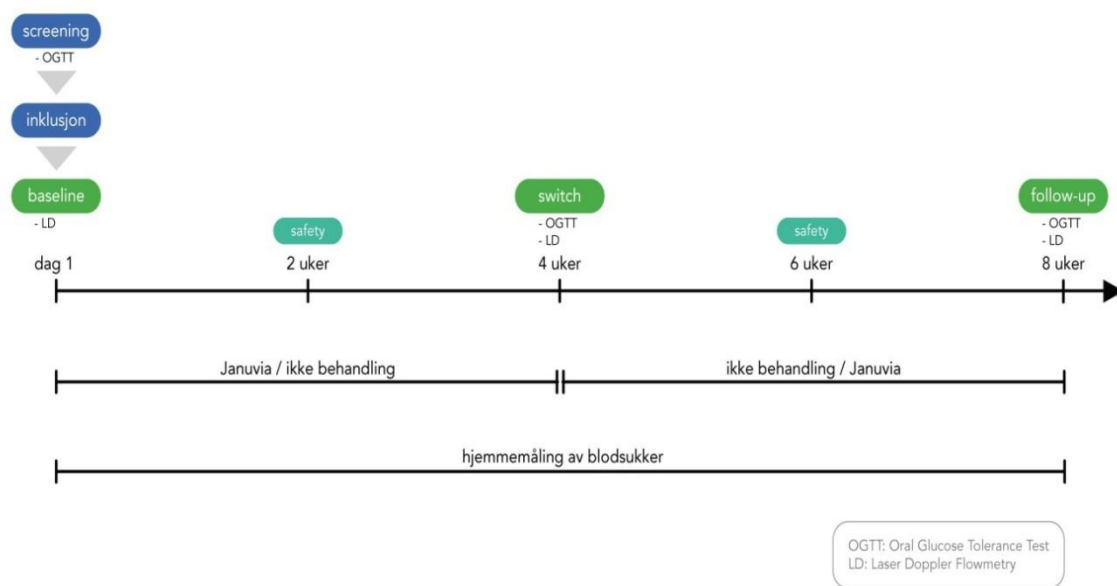
2.1 Studiedesign

Studien, en åpen, randomisert, kontrollert, cross- over studie, bestod av to perioder à 4 uker. En periode med sitagliptinbehandling, og en periode uten. Pasientene ble randomisert, ved trekning, til enten å starte med aktiv sitagliptinbehandling eller en kontrollperiode uten behandling. Doseringen av sitagliptin for den enkelte pasient ble bestemt på bakgrunn av estimert GFR (beregnet ved hjelp av MDRD- formelen) målt på dagen for oppstart med medikamentet. Sitagliptin 100 mg daglig ble gitt ved ved $GFR \geq 50$ (mL/min/1,73m²). Ved $GFR < 50 \geq 25$ mL/min/1,73m², ble dagsdose sitagliptin satt til 50 mg, altså ½ tablett daglig. Ellers ble det ikke gjort endringer i pasientenes legemiddelregime under noen del av studien. Endringer gjort av annen lege under studien, ble notert i CRFene.

Studien ble utført ved nyrefysiologisk laboratorium på OUS Rikshospitalet (Oslo universitet sykehus) og var ikke sponset av legemiddelprodusenten. Utgiftene, også til studiemedikamentet, ble betalt i sin helhet av nyrefysiologisk laboratorium.

Studien bestod av tre undersøkelsesdager på OUS Rikshospitalet og to sikkerhetskontroller på pasientens hjemsted. Undersøkelsesdagene fant sted ved dag 1 i studien (baseline), etter 4 uker (switch) og etter 8 (follow- up). Safety- kontrollene, bestående kun av blodprøver, ble lagt til uke 2 og uke 6 i studien.

Undesøkelsesdagene på nyrefysiologisk laboratorium forløp likt hver gang. De bestod av blodprøver, urinprøve, blodtrykksmåling, veiing av kroppsvekt, en oral glukosebelastning (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) og mikrovaskulær endotelfunksjons undersøkelse (laser Doppler flowmetri). Se figur 2.1 og tabell 2.1.



Figur 2.1: Studiedesign.

Tabell 2.1: Oversikt og rekkefølge over undersøkelsesdagene i studien.

	Baseline	Safety	Switch	Safety	Follow-up
Pasienten møter mat- og medikamentfastende på rikshospitalet	X		X		X
Pasienten møter mat- og medikamentfastende hos fastlege/ avtalt prøvetakingssted		X		X	
Blodprøvetaking	X	X	X	X	X
Nedfrysing av prøver for senere analyse av NO, C- peptid og insulin	X		X		X
Oralt inntak av glukoseløsning	X		X		X
Blodtrykksmåling	X		X		X
Veieing av kroppsvekt	X		X		X
Blodprøvetaking 30 min og 2t etter OGTT start, for analyse av plasmaglukose og seruminsulin	X		X		X
Avlevering av urinprøve (annen morgenurin)	X		X		X
Frokost og inntak av faste medisiner (morgendosering)	X		X		X
Legekonsultasjon	X		X		X
Randomisering	X				
Endotelfunksjonsundersøkelse	X		X		X
Opplæring i glukometer til hjemmebruk	X				

2.2 Pasienter

Potensielle studiedeltagere ble funnet ved hjelp av rikshospitalets database over undersøkelses resultater 10 uker post transplantasjon. Videre ble journalnotat og lignende sjekket før de aktuelle pasientene ble kontaktet av overlege prof. dr. med Trond Jenssen med forespørsel om deltagelse. Studieobjektene ble av praktiske og økonomiske årsaker, først og fremst rekruttert fra østlandsområde.

Studien ble godkjent av Statens legemiddelverk og Regional etisk komité (REK). Pasientinformasjon ble gitt både muntlig og skriftlig. Pasientenes samtykke til å delta i studien ble skriftlig innhentet i henhold til Helsinkideklarasjonen. Reiseutgifter i forbindelse med undersøkelsesdagene ble dekket, ellers ble det ikke gitt noen økonomisk kompensasjon. Se vedlegg 1-4.

Inklusjonskriterier:

- Stabile (med hensyn på kreatinin verdier og prednisolondose), nyretransplantete pasienter, som ble transplantert minst et år før inklusjon.
- Blodsukker tilsvarende WHO kriterier for diabetes eller nedsatt glukosetoleranse. Eller pasienter som allerede behandles med et oralt antidiabetikum, men som har Hb_{A1c} 8-11 %.
- > 18 år.
- Mann, ikke fertil kvinne, eller fertil kvinne som ikke ammer og som avgir negativ graviditetstest.

Eksklusjonskriterier:

- Insulinbehandling
- Alvorlig leversykdom
- Estimert GFR < 25 ml/min/1.73 m².
- Hudtilstander som kan påvirke laser Doppler flowmetri undersøkelsen

- Gravide eller ammende

2.3 Biokjemiske analyser

Fastende blodprøver ble tatt fra venekateteret innlagt i albuhasen. I disse ble blodkonsentrasjon av immunsuppressiva (CyA, Tacrolimus, Everolimus) bestemt. Blodprøvene ble også analysert med hensyn på hemoglobin, erytrocytter, trombocytter, leukocytter, urinsyre, natrium, kalium, kalsium, fosfat, bilirubin, ASAT, ALAT, LD, alkalisk fosfatase, GT, urea, kreatinin, HbA1c og CRP. Disse prøvene ble analysert ved Avdeling for medisinsk biokjemi, Rikshospitalet. Prøver til analyse for NO ble tappet på vakumglass tilsatt EDTA og straks satt på is. Deretter ble prøvene kjølesentrifugert og 4°C i 10 minutter. Blodprøver for analyse av C-peptid og insulin ble tappet på vakumrør tilsatt gel, satt til å koagulere i i romtemperatur i 15 minutter hvorefter prøvene ble sentrifugert ved 1500 g i 10 minutter. Serum ble så avpipettert med pasteurpipette og fordelt på to cryo- rør (Nunc CryoTubes™). Disse ble frosset ned ved -70 °C frem til de skulle analyseres.

2.4 Oral glukosebelastning

Fastende plasmaglukose ble målt ved å analysere ferskt fullblod, utatt fra venekateter i albuhasen, på et plasmakalibrert glukometer (HemoCue glucose 201, Ängelholm, Sverige). Undersøkelsen ble vurdert til å være trygg å gjennomføre dersom fastende blodsukker var < 9 mmol/L. Glukose (Glucosum anhydricum ad usum parenterale, Apotekproduksjon AS), 75g, utrørt i vann ble inntatt per oralt. Det ble observert at hele løsningen ble drukket. Plasmaglukose ble så målt 30 minutter og 2 timer etter inntak av sukkerløsningen. Blodprøver for analyse av C-peptid ble tatt fastende. Og blodprøver til insulinanalyse ble tatt ved alle tre målepunktene. Etter hvert prøveuttak fra venflonen ble 1 ml heparin (Heparin LEO 100IE/ ml, Leo Pharma, Ballerup, Danmark) injisert for å forhindre koagulasjon i venflonen.

2.5 Hjemmemåling av blodsukker

Pasientene fikk utdelt et glukometer til hjemmebruk av typen Freestyle Lite (Abbot). Nødvendig opplæring ble gitt, og det ble testet at pasienten kunne bruke apparatet. Hjemmemålingene skulle utføres 5 ganger daglig gjennom hele studien. Fastende før frokost, to timer etter frokost, to timer etter lunsj, to timer etter middag og to timer etter kveldsmat. Målingene ble notert i et utdelt skjema. Se vedlegg 5. Det var også et felt i skjemaet for å notere ned eventuelle ekstra målinger som ble gjort ved mistanke om hypoglykemi.

2.6 Analyse av NO

2.6.1 Bakgrunn for metoden

Halveringstiden til NO *in vivo* er svært kort, sannsynligvis < enn 0.1 sekund. NO blir oksidert til både nitritt og nitrat i blodet, men nitrat er kvantitativt den desidert viktigste metabolitten. Disse endeproduktene er betydelig mer stabile enn NO selv, og dermed langt mer egnet for kvantitativ bestemmelse av NO i biologiske væsker, enn direkte NO- analyse. Analysen baseres Griess Reaksjon, en tostegs reaksjon, hvor et diazoniumion dannes. Griess reaksjon er spesifikk for nitritt, så for å analysere både nitritt og nitrat, må nitrat først reduseres til nitritt ved en enzymatisk reduksjon. Nitrat reduktase ble brukt som reduksjonsmiddel og NADPH som kofaktor. Surt nitritt (NO_2^-) i prøven danner så en nitroagens og reagerer med aminogruppen i sulfanylsyren som tilsettes (Griess Reagens I). Det dannes da et diazonium kation. Det kromatografiske azoderivatet dannes når Griess reagens II tilsettes. Da binder diazonium ionet seg til N- (1- Naftyl) etylendiamin (Griess reagens II) [66]. Azoderivatet absorberer lys ved 540- 570 og optisk tetthet kunne derfor måles i en mikroplateleser (Labsystems Original Multiscan®).

2.6.2 Prøveopparbeidelse

Et NO- analyse kit ble brukt for å bestemme NO- konsentrasjonen i pasientprøvene (Parameter™, Total NO/ Nitrit/ Nitrate, R&D Systems, Minneapolis, USA). Prøvene ble fortynnet i forholdet 1:4 med Reaction Diluent (1X). Deretter ble de filtrert for å fjerne store plasmaproteiner, med filter med cut- off på 10 000 dalton (Ultrafree®-MC, Millipore, Bedford, USA), på en ultrasentrifuge ved 20 721 G i 40 minutter. Dette var nødvendig da plasmaproteiner kan interferere med Griess reaksjon.[66].

2.6.3 Analyse

Standardkurven ble laget ved en fortynningsrekke av den konsentrerte nitratstandard som fulgte med i kitet. Standardrekken bestod av løsninger med følgende konsentrasjoner; 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 og 3.125 $\mu\text{mol/L}$. I det første duplikatet av brønner på mikroplaten ble nullstandard, 50 μL fortynningsløsning (Reaction Diluent (1X)) applisert. De fortynnede standardløsningene ble pipettert i de påfølgende sju duplikatene (50 μL). 50 μL av hver av de fortynnede pasientprøvene ble så applisert i duplikat i de ledige brønnene. Videre ble 25 μL fortynnet NADH og 25 μL fortynnet Nitrate Reductase tilsatt alle brønnene. Deretter ble platen tildekket med plastfolie og inkubert i 30 minutter ved 37 °C. Alle brønnene ble så tilsatt 50 μL Griess reagent I, etterfulgt av 50 μL Griess reagent II. Se tabell 2.2. Før platen kunne leses av ble den igjen forseglet og inkubert ved romtemperatur i 10 minutter. Plateleseren målte optisk tetthet for hver brønn ved bølgelengde 540nm.

Tabell 2.2: NO- analyse. Oversikt over tilsetning av reagenser i de respektive brønnene på mikroplaten, volum i μL .

	Nullstandard	Standardrekke	Pasientprøve
Fortynningsløsning	50		
Nitratstandard		50	
Fortynnet pasientprøve			50
Fortynnet NADH	25	25	25
Fortynnet Nitratreduktase	25	25	25
Giriess reagens I	50	50	50
Griess reagens II	50	50	50

2.6.4 Beregninger

Databehandlingsprogrammet Genisis laget en standardkurve (OD versus konsentrasjon) ved hjelp av lineær kurvetilpasning av målte OD verdier for standardrekken. NO- konsentrasjonen i pasientprøvene ble bestemt ved at målt OD-verdi i disse ble sammenlignet mot standardkurven. Fortynningsfaktoren på 4 ble tatt hensyn til.

2.6.5 Validering av NO- analyse

Metoden er tidligere validert ved Nyrefysiologisk laboratorium. Intra assay variasjonskoeffesienten varierte fra 4% til 14%, med gjennomsnittlig variasjonskoeffesient på 8,9 %. Inter assay variasjonskoeffesienten varierte fra 13,6% til 35,9% med et gjennomsnitt på 21,3 %. Gjennomsnittlig recovery lå på 60 %. [67].

2.7 Analyse av C- peptid

2.7.1 Bakgrunn for metoden

Proinsulin, forløperen til insulin, består av en A- og B- kjede og c- peptid. C- peptidet avspaltes, og det oppstår en disulfidbinding mellom A- og B- kjeden, og det er disse to kjedene som desmed utgjør insulin. C- peptid har inntil nylig kun blitt sett på som et biologisk inert avspaltningsprodukt. Og man har trodd at dens eneste funksjon har vært og koble og stabilisere A- og B- kjeden i proinsulin, for å sikre riktig binding av de to kjedene ved avspalting av c- peptidet [68]. Men nyere forskning viser at C- peptid kan ha flere fysiologiske effekter. Det viser seg at det antatt inaktive peptidet binder seg med høy affinitet til cellemembraner og det er foreslått en G- protein koblet reseptor for C- peptid. Blant mulige C- peptid medierte effekter som er studert er økt NO- frigjøring fra endotelceller og blodsukkerreduserende effekt [69]. C- peptid frigjøres i ekvimolare mengder med insulin og er i motsetning til insulin i svært liten grad utsatt for first pass metabolisme i lever. Derfor er det et godt og mye brukt surrogatmål på insulinfrigjøring [68]. For å bestemme C- peptid konsentrasjonene ble det brukt et ELISA kit for C- peptid. (C- peptide, DakoCytomation, Cambridgeshire, Storbritannia.) Metoden baserer seg på et enzyme- linked immunosorbent assay (ELISA) hvor det brukes to monoklonale antistoffer. C- peptid bundet til antistoff detekteres spektrofotometrisk.

2.7.2 Analyse

Kalibratorene og pasientprøvene ble applisert i duplikat i brønnene på den antistoffcoatede mikroplaten (25 μ L i hver brønn). 100 μ L konjugat ble tilsatt i alle brønnene og platen ble inkubert med risting i 60 minutter ved romtemperatur. Platen ble vasket manuelt tre ganger med Wash Buffer (X15). Deretter ble det tilsatt 100 μ L substrat (3,3',5'- tetrametylbenzidin (TMB)). Platen ble inkubert med risting på nytt, denne gangen i 10 minutter ved romtemperatur. Reaksjonen mellom substratet og

Materialer og metode

bundet konjugat ble stoppet ved tilsetning av 100µL Stop Solution (syre) i hver brønn. Se tabell 3.3. OD ble målt på en plateleser (Wallac VICTOR3™, 1420 multilabel counter, Perkin Elmer, Turku, Finland) ved bølgelengde 450 nm.

Tabell 2.3: C- peptid- analyse. Oversikt over tilsetning av reagenser i de respektive brønnene på mikroplaten, volum i µL.

	Standardrekke	Pasientprøve
Standard	25	
Pasientprøve		25
Konjugat	100	100
Vaskeløsning	3* 250	3* 250
Substrat	100	100
Stopp- løsning	100	100

2.7.3 Beregninger

Plasmakonsentrasjonene av C- peptid ble hentet ut fra dataprogrammet (Wallac 1420 Manager, Software version 3.0, Perkin Elmer, Turku, Finland). Dataprogrammet laget en standard kurve (OD versus konsentrasjon) ved hjelp av fire parameters kurvetilpasning av målte OD- verdier for standardrekken. Konsentrasjonen av C- peptid i pasientprøvene ble bestemt ved sammenligning av OD i disse brønnene mot standardrekken.

2.7.4 Validering

I spesifikasjonen til kitet angis en gjennomsnittlig variasjonskoeffesient for intra assay presisjon på 3,3 %. For inter assay presisjon er gjennomsnittlig variasjonskoeffesient 3,1 %. Gjennomsnittlig recovery er 98,2 %.

2.7.5 C- peptid til glukose, kreatinin ratio (CPGCR)

CPGCR (C- peptide to glucose, creatinine ratio) ble beregnet etter følgende formel:

$$\text{CPGCR} = (\text{C- peptid (nm/ L)} * 100) / (\text{glukose (mmol/ L)} * \text{kreatinin (}\mu\text{mol/ L)})$$

Prøvene for alle tre parameterene som inngår i utregningen ble tatt fastende, på samme tid.

2.8 Analyse av Insulin

2.8.1 Bakgrunn for metoden

Som beskrevet i avsnitt 2.4, ble en sukkerløsning inntatt oralt og blodprøver tatt før inntak, 30 minutter etter inntak og 2 timer etter inntak av løsningen. For å måle insulinkonsentrasjonen i prøvene ble det brukt et ELISA- kit (Human Insulin, Invitrogen, Camarillo, USA). Analysen er basert på monoklonale antistoffer som er spesifikke for bestemte insulinepitoper. Ved hjelp av substratet TMB (tetrametylbenzidin), som festes til bundet antistoff, og gir en fargereaksjon, kan OD i brønnene på platen avleses spektrofotometrisk. Fargeintensiteten som leses av er direkte proporsjonal med insulinkonsentrasjonen i prøven.

2.8.2 Analyse

50 µL prøve, kontroll eller standard ble applisert i to paralleller på den antistoff-coatede mikroplaten. Deretter ble 50 µL HRS (horseradishperoxidase), bundet til antistoff, tilsatt i disse brønnene. Platen ble inkubert i en time i romtemperatur på en rister, for så å bli vasket. Fargeløsningen (substratet) ble tilsatt og platen ble inkubert i romtemperatur i 15 minutter beskyttet mot lys. Reaksjonen ble så stoppet ved tilsetning av Stop Solution (HCl) og platen ble avlest ved 450 nm av plateleseren

Materialer og metode

(Wallac VICTOR3™, 1420 multilabel counter, Perkin Elmer, Turku, Finland). Se tabell 2.4.

Tabell 2.4: Insulin- analyse. Oversikt over tilsetning av reagenser i de respektive brønnene på mikroplaten, volum i µL.

	Standardrekke	Kontroller	Blank	Pasientprøve
Standard	50			
Kontroller		50		
Pasientprøve				50
Antistoff	50	50		50
Vaskeløsning	3* 400	3* 400	3* 400	3* 400
Substrat	100	100	100	100
Stopp- løsning	100	100	100	100

2.8.3 Beregninger

Plasmakonsentrasjoner av insulin ble avlest i dataprogrammet (Wallac 1420 Manager, Software version 3.0, Perkin Elmer, Turku, Finland). Konsentrasjonene ble beregnet av dataprogrammet, ved sammenligning av OD i pasientprøvene mot standard kurven. .

2.8.4 Validering

I kitets spesifikasjon opplyses gjennomsnittlig variasjonskoeffesient å være 5,4 % for intra- assay presisjon og 8,6 % for inter- assay presisjon. Gjennomsnittlig recovery er 93,1 %.

2.8.5 Insulinsensitivitet

Insulinsensitivitet ble utregnet ved formelen for insulinsensitivitet for transplanterte :

[70]

$$ISI_{Tx} = 0,208 - 0,0032 * BMI - 0.0000645 * Ins_{120} - 0.00375 * Gluc_{120}$$

Insulinsekresjon estimeres med Stumvoll's algoritme:

$$Secr_{1,phase} = 1283 + 1,829 * Ins_{30} - 138,7 * Gluc_{30} + 3,772 * Ins_0$$

$$Secr_{2,phase} = 287 + 0,4164 * Ins_{30} - 26,07 * Gluc_{30} + 0,9226 * Ins_0$$

[71]

2.9 Mikrovaskulær endotelfunksjon

Laser Doppler- flowmetri i kombinasjon med iontoforese av acetylkolin og reaktivhyperemitest ble brukt for å måle mikrovaskulær endotelfunksjon.

2.9.1 Laser Doppler

En laserprobe festes i et kammer på huden og monokromatisk laserlys fra en helium-neon laser ledes ned i huden (1-1,5mm) ved hjelp av fiberoptikk. Partiklene i blodet, først og fremst erytrocytter, som passerer i dette området treffes av fotoner. Disse fotonene gjennomgår et frekvensskifte i overensstemmelse med Doppler- prinsippet. En del av lyset, både av det som er dopplerskiftet og det som ikke er det, reflekteres og mottas av en diode på proben. Instrumentet inneholder også en fotodetektor hvor Doppler- komponenten kan isoleres. Apparatet regner ut summen av gjennomsnittshastigheten til erytrocyttene multiplisert med konsentrasjonen av erytrocytter ut i fra laser- Doppler signalet. Videre utgis det et elektrisk signal som er

proporsjonalt med hastigheten og mengden av røde blodceller som beveger seg i området som belyses ("red cell flux"). Teknikken kan kun brukes i relative målinger og gir ikke en absolutt verdi for blodgjennomstrømning [72].

2.9.2 Iontoforese og endotelavhengig vasodilatasjon

Iontoforese er en teknikk der ioniske stoffer administreres ned i huden, til mikrosirkulasjonen, ved hjelp av svak elektrisk strøm. Det elektriske feltet gjør at ionene beveger seg fra iontoforesekommeret der substansløsningen appliseres, og ned i huden. Mengden substans som transporteres over huden er proporsjonal med applisert ladning. Den elektriske ladningen på molekylene vil avgjøre hvilken retning de migrerer i. Teknikken kan brukes for å undersøke den lokale effekten av vasodilaterende substanser i mikrosirkulasjonen. Da festes de to LD- probene til hvert sitt iontoforesekommer. Det ene fylles med en løsning av en vasodilaterende substans (anoden) og det andre med en referanseløsning (katoden). Acetylcholin er standard vasodilaterende substansen som oftest brukes. Mekanismen for dens vasodilaterende evne under iontoforese er omdiskutert. Produksjon av NO og/ eller prostanoide, alternativt at endotelderivert hyperpolariserende faktor spiller en rolle, er foreslått. [73]. Bruk av en hyperosmolar salt løsning av (5 M NaCl) har vist å minimalisere den uspesifikk vasodilatasjonen som oppstår ved iontoforesen [74]. Katoden, hvor NaCl appliseres, innehar en kontrollfunksjon ved at fraværende respons her, indikerer at det ikke opptrer en uspesifikk vasodilatasjon under katoden. Fire ganger tilføres strøm av økende styrke over kretsen. Dermed blir ulik mengde Ach administrert. Laseren detekterer endringene i blodgjennomstrømning. Det elektriske signalet som utgis er proporsjonalt med hastigheten og volumet av blodlegemene som passerer laseren. Produktet av hastigheten og volumet kalles fluks.

2.9.3 Postocclusive Reactive Hyperaemia (PORH)

PORH er økt blodtilstrømning i et område hvor blodgjennomstrømningen midlertidig har blitt stoppet. Denne økningen kan måles ved å pumpe opp en blodtrykksmansjett festet til overarmen, til supersystolisk trykk en gitt tid for å så tømme mansjetten for luft [72]. En okklusjonstid på 3 minutter er funnet hensiktsmessig [75]. Under okklusjonen vil fluksen reduseres til det biologiske nullnivået. Når mansjetten tømmes, stiger fluksen til et maks nivå ($Peak_{th}$), for så å synke til hvilenivået den hadde før okklusjonen. Graden av PORH som oppstår kan si noe om endotelfunksjonen. Friske personer vil raskt oppnå en maksimum fluks, etterfulgt av en saktere reduksjon ned mot hvilenivå [76].

2.9.4 Praktisk prosedyre

1 % Ach- løsning ble tilberedt om morgenen på undersøkelsesdagen. 10 ml ione-fritt vann ble da tilsatt et hetteglass med 100 mg frysetørket Acetylkinorid. Løsningen ble oppbevart i kjøleskap frem til bruk. Undersøkelsen ble gjennomført etter at glukosebelastningen var avsluttet og pasienten hadde spist frokost og inntatt morgendosen med medisiner. Under hele undersøkelsen lå pasienten rolig på ryggen i sengen. Pasienten fikk ligge i ro cirka 20 minutter før undersøkelsen startet. Underarmen (uten eventuell AV- fistel eller store hematomer) ble vasket tre ganger for å fjerne rester av interfererende ioner, såpe og krem. Først med sprit, så med vann, og tilslutt med sprit igjen. Blodtrykksmansjetten ble satt på rundt overarmen. LD-probene (DP1T/7 large area probe, Moor Instruments, England) ble festet i hvert sitt Perspex ionekammer med platina elektrode (ION Moor Instruments LTd., Axminster, UK. 30mm total diameter x 7mm høyde; indre diameter 9,5 diameter x 2mm høyde). De to kammerene ble festet på et egnet område (uten arr, store årer og hårsekker) med dobbeltsidig teip, hvor baseline- flux verdiene var mellom 15 og 25 arbitrære enheter (AU). ACh- og NaCl- løsningene ble sprøytet inn i hvert sitt kammer slik at mellomrommene mellom laserprobene og huden var fullstendig fylt med væske, og ingen luftbobler forstyrret.

Iontoforeseprogrammet ble startet og effekten av ACh ble undersøkt ved tilførsel av 50 μA , 75 μA , 100 μA og 150 μA . Hver av iontoforesestrømmene hadde en varighet på 10 sekunder etterfulgt av en monitoreringsperiode på 6 minutter. Deretter ble laserproben fra anoden flyttet til et rent kammer, som ble festet på et annet sted på den samme underarmen. Reaktiv hyperemittest ble så utført ved å pumpe opp blodtrykksmansjetten til 280 mmHg. Trykket ble holdt i 3 minutter før luften ble sluppet ut og målingen av PORH startet.

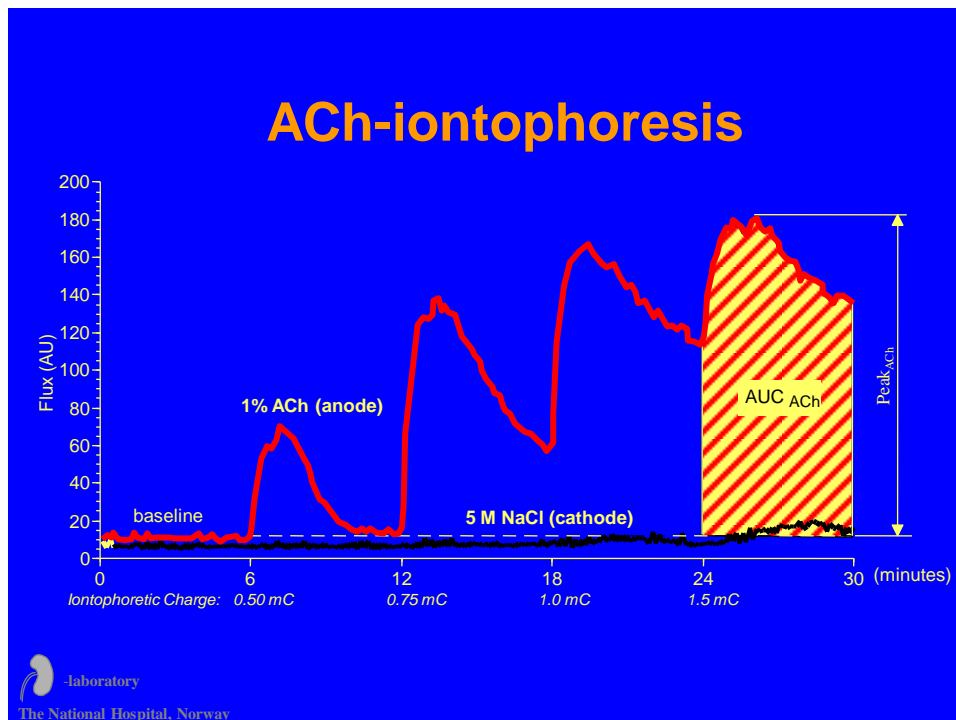
2.9.5 Beregninger

Fluks- endringer ble målt med DRT4 (Laser Doppler Perfusion and Temperature Monitor, DRT4, MOOR Instruments Ltd., England) og analysert ved hjelp av MoorSOFT software package (Laser Doppler Perfusion Monitor, 2.0, Moor Instruments Ltd., UK). Baseline- verdien ble beregnet som gjennomsnittlig fluks over tre minutter før start av iontoforesen. Responsen fra ACh- stimulering ble beregnet ved følgende parametre:

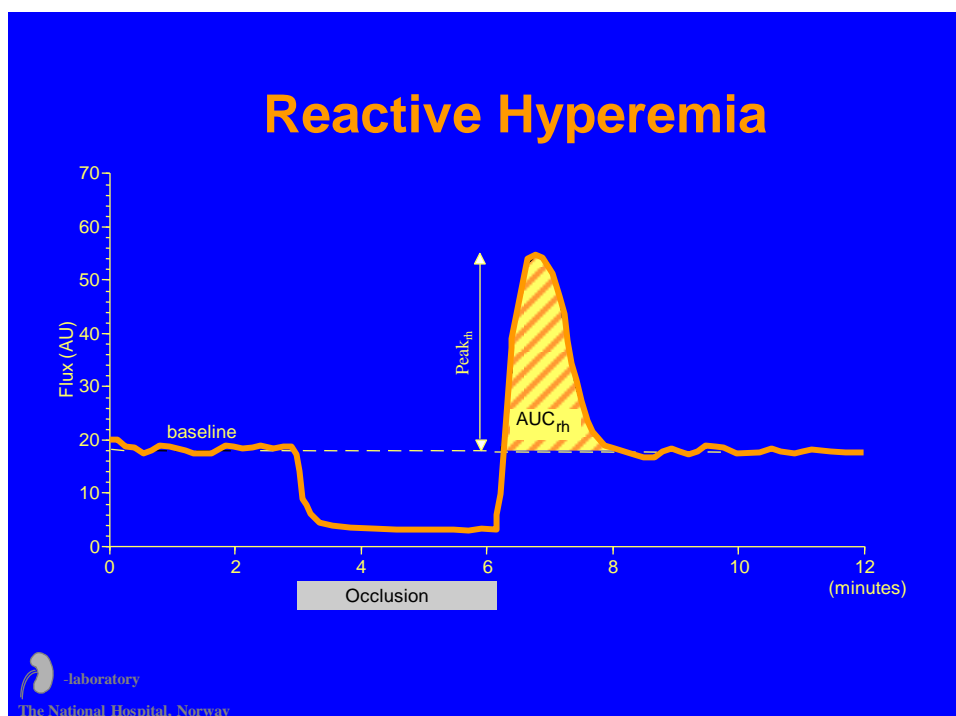
- Peak fluks etter 150 μA (PeakACh)
- Arealet under fluks- versus tid kurven i monitoreringsperioden (6 minutter) etter stimuleringen med 150 μA (AUCACH)

AUCACH ble avlest direkte fra statistikkfunksjonen i MoorSOFT. Mens PeakACh ble avlest manuelt fra en glattet fluks- versus tid kurve, for å unngå innvirkningen av puls i årene.

Eksklusjonskriteriet var uspesifikk $\text{AUC} > 200 \text{ AU}^* \text{ min}$. For verdier høyere enn 200 $\text{AU}^* \text{ min}$ vil den uspesifikke vasodilatasjonen være stor nok til å påvirke den vasodilaterende effekten av ACh. Dette er predefinerte eksklusjonskriterier basert på empiri.



Figur 2.2 a: Flukskurve (tid versus fluks) etter iontoforese av acetylcholin, målt med Laser Doppler.



Figur 2.2 b: Flukskurve (Tid versus fluks) Ved post okkulsiv reaktiv hyperemi, målt med Laser Doppler.

2.10 Blodtrykk

Etter cirka 10 minutters hvile, ble blodtrykket målt sittende Blodtrykksapparatet som ble brukt var Dyna Map (Tuff.-Cuff, CAS Medical system Inc.) Gjenommsnittet av de to siste målingene ble brukt.

2.11 Urin

Annen morgenurin ble avgitt på undersøkelsesdagene. Urinprøvene ble analysert på Klinisk Kjemisk Avdeling på Rikshospitalet. Der ble de testet med stix for glukose, protein, blod, leukocytter og pH.

2.12 Compliance

Ved utlevering av Januvia® tabletter, fikk pasientene beskjed om å ikke kaste tabletter som ble til overs, eller som de hadde glemt og ta. Esken med blisterpakningene ble innlevert ved neste undersøkelses dag. Compliance ble kontrollert ved tablettelling.

2.13 Statistikk

Statistiske analyser ble utført ved hjelp av programvaren SPSS 16.0. Fordelingen av rådataene ble undersøkt og testet for normalitet. Paret t- test og Wilcoxon signed rank test ble benyttet for å teste for statistisk signifikans. Resultatene er oppgitt som $\text{gjenomsnitt} \pm \text{standaravvik}$ for normalfordelte data, og median(range (25 og 75% percentilen)). Grensen for statistisk signifikans ble satt til $p < 0,05$.

3. Resultater

3.1 Pasienter

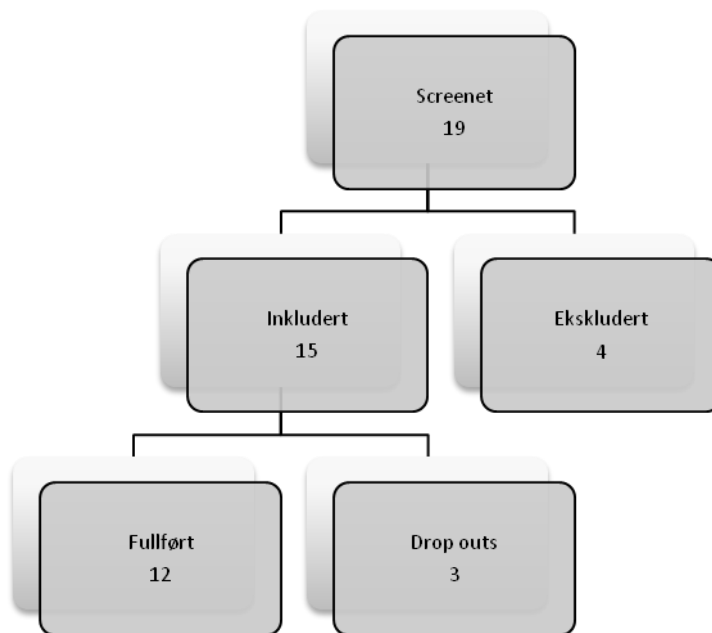
19 pasienter ble screenet for mulig deltakelse i studien. Screeningundersøkelsen bestod i oral glukosebelastningstest (oral glucose tolerance test = OGTT), for å undersøke om glukoseverdiene passet inklusjonskriteriene, og en generell medisinsk vurdering. På bakgrunn av resultatene ble 4 potensielle studiedeltagere ekskludert grunnet normoglykemi. Se figur 3.1. Av de 15 inkluderte fullførte 12 pasienter studien, hvorav 5 kvinner og 7 menn. Tre pasienter ble tatt ut av studien underveis, hvorav 1 kvinne og to menn. En pasient ble tatt ut grunnet mulige bivirkninger. Den andre pasienten fikk et cerebralt insult i perioden med sitagliptin- behandling. Hendelsen antas ikke å ha sammenheng med sitagliptin- behandlingen, men ble meldt som serious adverse event (SAE) til forskningsetisk komité. Pasienten er etterpå, tilsynelatende, uten varige mén, og er under rehabilitering. Den siste pasienten ble tatt ut da han etter gjennomført kontrollperiode fremviste normal glukosebelastning.

Gjennomsnittsalderen ved inklusjon var 63,5år, og median tid siden transplantasjon var 3,3 år. Se tabell 3.1. Alle pasientene ble behandlet med prednisolon. Åtte pasienter ble behandlet med CyA og mykofenolat, en med CyA og everolimus. To pasienter ble behandlet med tacrolimus, hvorav den ene også fikk mykofenolat. En pasient ble behandlet med everolimus og mykofenolat. Av de totalt 12 pasientene som gjennomførte studien, hadde fem av pasientene etablert behandling med et per oralt antidiabetikum da de ble inkludert. Se tabell 3.2. Av disse fem ble fire behandlet med glipizid og en med glimepirid. Ingen av studiedeltagerene var diagnostisert med diabetes mellitus før transplantasjon. En av tolv pasienter ble transplantert preemtivt og to med levende donor. Seks pasienter hadde HLA DR mismatch 0, fem pasienter hadde 1, mens HLA DR mismatch er ukjent for en pasient. HLA AB mismatch er også ukjent for denne pasienten (årsaken er manglende tilgang på data, da pasienten er transplantert for 26 år siden.). For de resterende pasientene var HLA AB mismatch

Resultater

som følger: 1; tre pasienter, 2; tre pasienter, 3; tre pasienter, 4; to pasienter.

Sykdommen som førte til behov for nyretransplantasjon er ukjent for to av studiedeltagerene. Polycystisk nyresykdom var årsak til transplantasjon hos fire, og nefrosklerose for tre. For tre av pasientene var årsaken henholdsvis kronisk glomerulonefritt, interstitiell nefritt og fokal segmental glomerulosklerose.



Figur 3.1. Antall pasienter som ble screenet, inkludert og ekskludert i studien. Og antall studiedeltagere som fullførte studien og som ble tatt ut underveis.

Tabell 3.1: Demografiske data. Oppgitt i gjennomsnitt±standardavvik,median(range), eller antall.

Alder (år)	63.5±8.3
Kjønn (mann/kvinne)	7/5
Tid siden tx (år)	3.3 (2.0-5.2)
Donor (LD/DD)	2/10
Preemptiv tx (ja/nei)	1/10 +1 ukjent
Medikamentell diabetesbehandling ved inklusjon (ja/nei)	5/7
Estimert GFR (mL/min/1.73m ²)	59.3±30.0
Blodtrykk (mm/Hg)	
Systolisk	144±19
Diastolisk	87±11
MAP	106±11
Sitagliptin dose (50mg/ 100mg)	3/9

Tx: transplantasjon

Tabell 3.2: Immunsuppressivt legemiddelregime for alle pasientene, oppgitt i mg/døgn.

Pasientnr.	CyA	Tacro	Mykofenolat-mofetil	Mykofenolat-natrium	Everolimus	Prednisolon
1	75		2000			5
2				1440	4	5
3	200		2000			5
4	200			720		7.5
6	200		2000			5
7	200		2000			5
8	300		2000			5
10		2				2.5
11	150		2000			5
12	200		2000			7.5
13	100				1.5	5
14		3		360		5

3.2 Biokjemiske analyser

Som det kan sees av tabell 3.4, oppstod ingen relevante forandringer i blodkonsentrasjonene for de immunsuppressive legemidlene gjennom studien. For blodkonsentrasjonen av CyA og mykofenolat ble ingen signifikante forskjeller funnet mellom deltaverdiene for kontrollperioden versus baseline og sitagliptinbehandling versus baseline, ($p = 0.734$, $p = 0.172$). Kun to pasienter ble behandlet med tacrolimus, og to med everolimus, så endringer i blodkonsentrasjonen gjennom studien ble ikke testet for statistisk signifikans. Se tabell 3.4. Ingen klinisk relevante funn ble gjort i analysen av de andre biokjemiske parametrene. Se tabell 3.5.

Tabell 3.4: Konsentrasjon av immunsuppressive legemidler i blodet gjennom studien.

<i>Pasientnr og tidspunkt</i>	CyA (µg/ L)	Tacro (µg/ L)	Mykofenolat (mg/ L)	Everolimus (µg/ L)
1 Baseline	55		4.4	
1 Kontrollperiode	40		2.7	
1 Sitagliptinbehandling	35		5.4	
2 Baseline			12.9	9.3
2 Kontrollperiode			6.7	8.5
2 Sitagliptinbehandling			7.2	7.0
3 Baseline	125		4.9	
3 Kontrollperiode	155		2.9	
3 Sitagliptinbehandling	95		0.9	
4 Baseline	60		0.6	
4 Kontrollperiode	100		1.1	
4 Sitagliptinbehandling	135		6.7	
6 Baseline	115		3.0	
6 Kontrollperiode	135		2.0	
6 Sitagliptinbehandling	145		2.5	
7 Baseline	55		1.3	
7 Kontrollperiode	65		0.7	
7 Sitagliptinbehandling	55		0.8	
8 Baseline	140		0.8	
8 Kontrollperiode	160		0.7	
8 Sitagliptinbehandling	240		0.5	
10 Baseline		6.7		
10 Kontrollperiode		6.6		
10 Sitagliptinbehandling		6.8		
11 Baseline	120		2.1	
11 Kontrollperiode	150		2.3	
11 Sitagliptinbehandling	150		4.7	
12 Baseline	100		3.0	
12 Kontrollperiode	80		3.4	
12 Sitagliptinbehandling	65		3.2	
13 Baseline	60			9.8
13 Kontrollperiode	< 25			5.1
13 Sitagliptinbehandling	30			6.0
14 Baseline		4.6	2.7	
14 Kontrollperiode		4.5	3.0	
14 Sitagliptinbehandling		5.1	3.2	

Tabell 3.5: Biokjemiske parametre ved undersøkelsesdagene. Oppgitt i gjennomsnitt±standardavvik.

Parameter	Baseline	Kontrollperiode	Sitagliptin- behandling
Hemoglobin (g/dL)	13.0±1.7	12.7±2.0	12.9±2.0
Erytrocytter (10 ⁹ /L)	4.3±0.5	4.3±0.5	4.2±0.6
Trombocyter (10 ⁹ /L)	235.0±45.8	233.2±62.2	223.6±52.9
Leukocyter (10 ⁹ /L)	6.9±1.3	6.8±1.7	7.1±2.0
Urinsyre (µmol/L)	429.5±117.5	412.5±93.8	454.0±110.3
Natrium (mmol/L)	142.5±1.6	142.7±2.1	142.9±2.1
Kalium (mmol/L)	3.9±0.4	4.1±0.6	4.0±0.4
Calcium (mmol/L)	2.4±0.1	2.4±0.2	2.4±0.1
Fosfat (mmol/L)	1.1±0.4	1.2±0.4	1.1±0.3
Bilirubin (µmol/L)	9.7±2.7	8.5±3.2	9.0±2.6
ASAT (U/L)	26.3±11.7	23.1±5.3	23.1±4.8
ALAT (U/L)	24.0±11.8	22.8±6.3	21.7±6.8
LD (U/L)	216.8±48.7	208.1±41.0	197.8±30.8
Alkalisk fosfatase (U/L)	80.7±48.4	81.8±45.8	75.5±41.9
GT (U/L)	41.5±33.9	60.8±77.8	45.1±47.2
Urea (mmol/L)	11.9±6.0	12.0±7.3	12.5±5.6
Kreatinin (µmol/L)	120.7±57.5	124.3±74.7	128.1±72.0
HbA1c (%)	6.7±0.4	6.7±0.6	6.5±0.5
CRP (mg/L)	4.3±4.2	4.1±3.9	3.7±3.1
Estimert GFR (mL/min/1.73m ²)	59.3±30.0	61.0±32.4	57.8±30.0

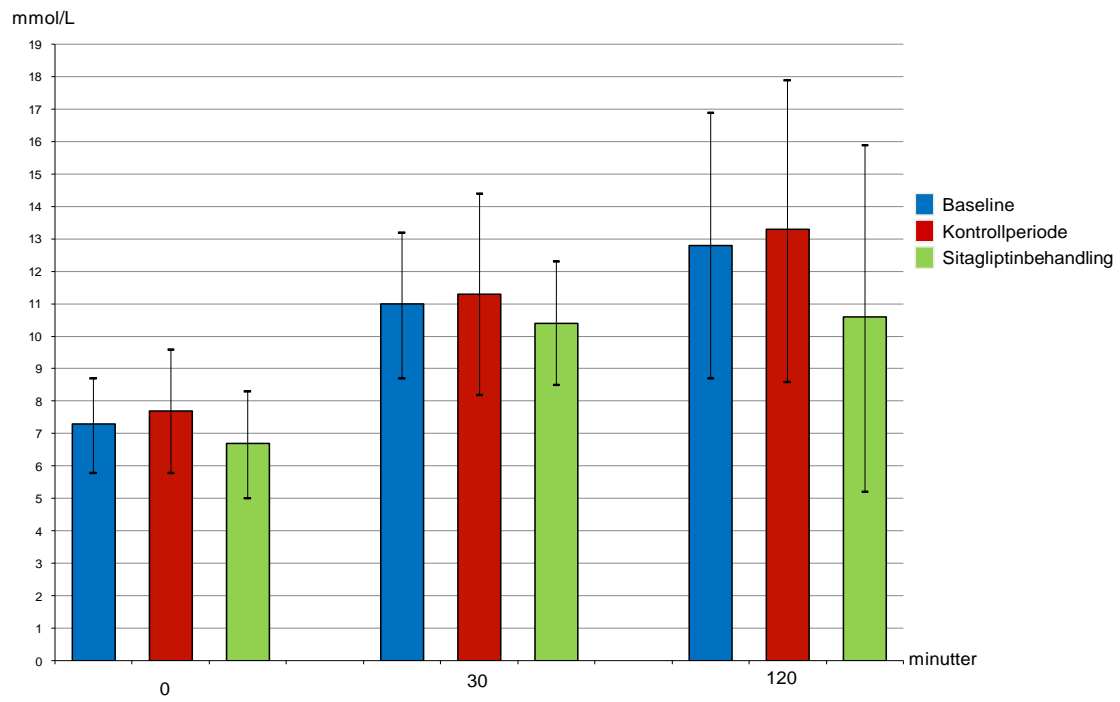
3.3 Oral glukosebelastning

Glukosebelastningen ble ikke gjennomført på to av pasientene, da fastende plasmaglukose var >9 mmol/L ved baseline. Fastende glukose ble likevel målt. Reduksjonen i plasmaglukose med sitagliptinbehandling i forhold til baseline, sammenlignet med kontrollperioden (også målt mot baseline), var statistisk signifikant for målingene 0 og 120 minutter (p= 0.045, p= 0.022). Reduksjonen i

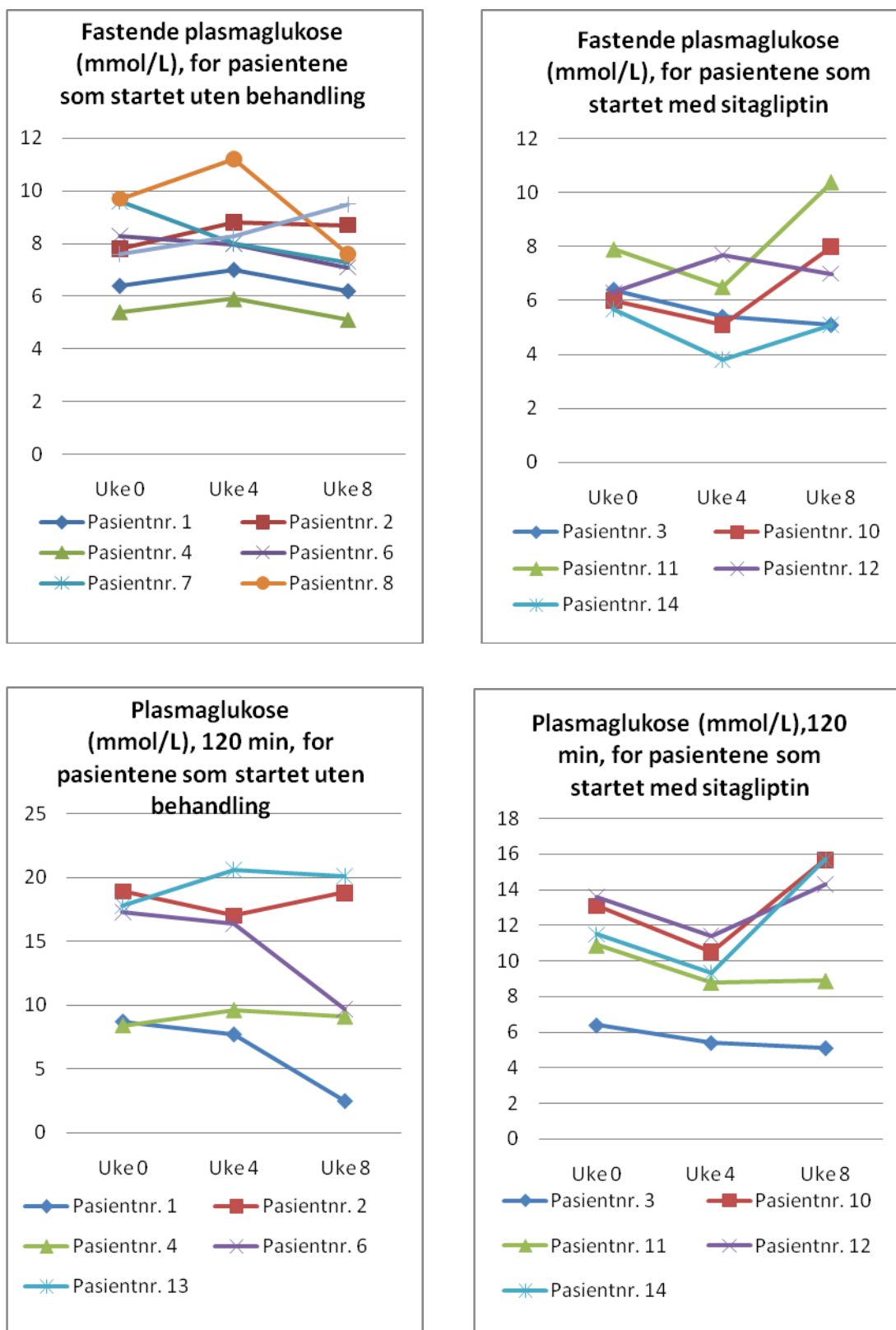
plasmaglukose ved 0 og 120 min, på -0,59 og -2,19 mmol/L, tilsvarer en prosentvis nedgang på 8,3% og 17,1%. Halvtimesprøven viste også en numerisk reduksjon, -0,61 mmol/L (-5,5%), men denne var ikke statistisk signifikant ($p=0.086$). Se tabell 3.6 og figur 3.2. Det så ikke ut til å ha betydning for resultatene om pasientene startet med eller uten aktiv behandling. Se figur 3.3.

Tabell 3.6: Oversikt over gjennomsnitt±standardavvik plasmaglukoseverdier(mmol/L) fra OGTT .

	0t	30 min	120 min
Baseline	7.3±1.5	11.0± 2.2	12.8± 4.1
Kontrollperiode	7.7±1.9	11.3± 3.1	13.3± 4.7
Etter sitagliptin-behandling	6.7±1.6	10.4± 1.9	10.6± 5.3
P- verdi for endring under behandling versus endring under kontrollperiode	.045	.086	.022



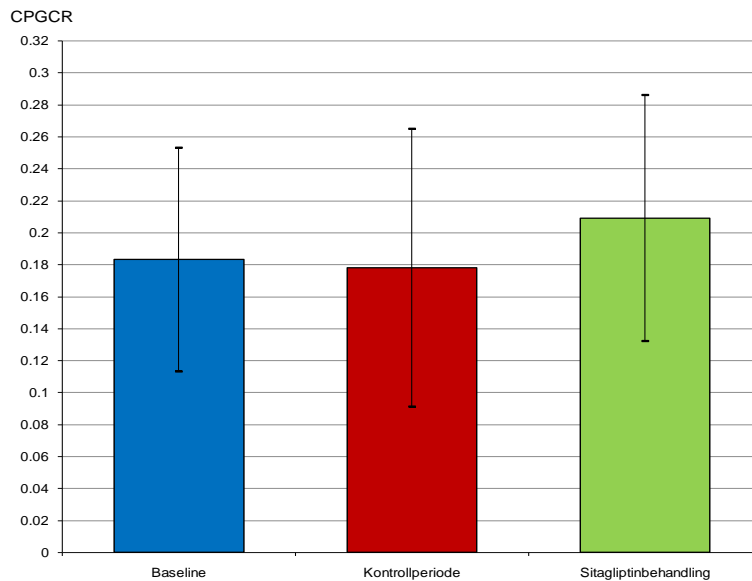
Figur 3.2: Plasmaglukose (mmol/L) i gjennomsnitt og standardavvik under OGTT.



Figur 3.3 Plasmaglukose (mmol/L) under OGTT fordelt på pasientene som startet med eller uten aktiv behandling.

3.4 Analyse av C- peptid og beregning av CPGCR

Gjennomsnittlig Δ CPGCR var $0,026 \pm 0,054$ og $-0,005 \pm 0,039$, for henholdsvis sitagliptin- behandling sammenlignet med baseline, og kontrollperioden sammenlignet med baseline. Økningen i CPGCR på 14% var statistisk signifikant ($p = .043$). Konsentrasjonen av C- peptid i pasientprøvene er gjengitt i vedlegg 6c.



Figur 3.4: CPGCR ved hver av undersøkelsesdagene, oppgitt i gjennomsnitt \pm standardavvik.

3.5 Analyse av insulin og beregning av insulinsensitivitet og insulinsekresjon

3.5.1 Insulinsekresjon

OGTT ble ikke gjennomført på to pasienter som hadde fastende plasmaglukose på $>9\text{mmol/L}$ ved inklusjon. To pasienter hadde fastende serum insulinkonsentrasjon lavere enn nedre deteksjonsnivå for analysemetoden. Første- og andrefase insulinsekresjon kunne derfor ikke beregnes for disse fire pasientene. For to pasienter

manglet resultater på insulinkonsentrasjon for to av undersøkelsesdagene. Forskjellen mellom kontrollperioden og perioden med aktiv behandling, målt mot baseline, kunne derfor ikke måles. I tabell 3.7 vises gjennomsnittlig første- og andrefase insulinsekresjon, for de seks pasientene det forelå data til å beregne insulinsekresjon ved alle tre undersøkelsesdagene. Sitagliptin gav ingen økning i 1. fase insulinsekresjon, sammenlignet med kontrollperioden, men en liten, numerisk, økning i 2. fase insulinsekresjon. Ved korreksjon for glukoseverdi ble økningen i 1. fase insulinsekresjon numerisk større enn for kontrollperioden, men ikke signifikant. Endringen i 2. fase insulinsekresjon ble heller ikke statistisk signifikant etter korreksjon for glukoseverdi. Insulinkonsentrasjonene for den enkelte pasient i vedlegg 6b.

Tabell 3.7. Median(range) insulinsekresjon, for de seks pasientene det forelå data til å regne ut endring i insulinsekresjon med og uten sitagliptin, mot baseline.

	1. fase insulinsekresjon	2. fase insulinsekresjon
Baseline	572.28(464.37-687.31)	192.44(175.30-214.04)
Kontrollperiode	657.33(629.74-737.58)	213.52(195.81-237.49)
Sitagliptin- behandling	901.64(731.08-1496.71)	272.69(229.13-416.17)
Endring etter sitagliptin-behandling fra baseline	94.10(-30.83-481.92)	19.69(-5.50-107.72)
Endring etter kontrollperiode fra baseline	100.92(-289.65-193.64)	13.10(-79.04-41.72)

3.5.2 Insulinsensitivitet

Gjennomsnittlig ISI_{tx} var $0,040729 \pm 0,0288100$, $0,047809 \pm 0,0243727$ og $.045748 \pm .0448963$ for henholdsvis baseline, kontrollperioden og perioden med sitagliptin. Det var ingen statistisk signifikans mellom sitagliptinbehandling og kontrollperioden, når begge ble målt mot baseline ($p = 0.820$).

3.6 Hjemmemåling av blodsukker

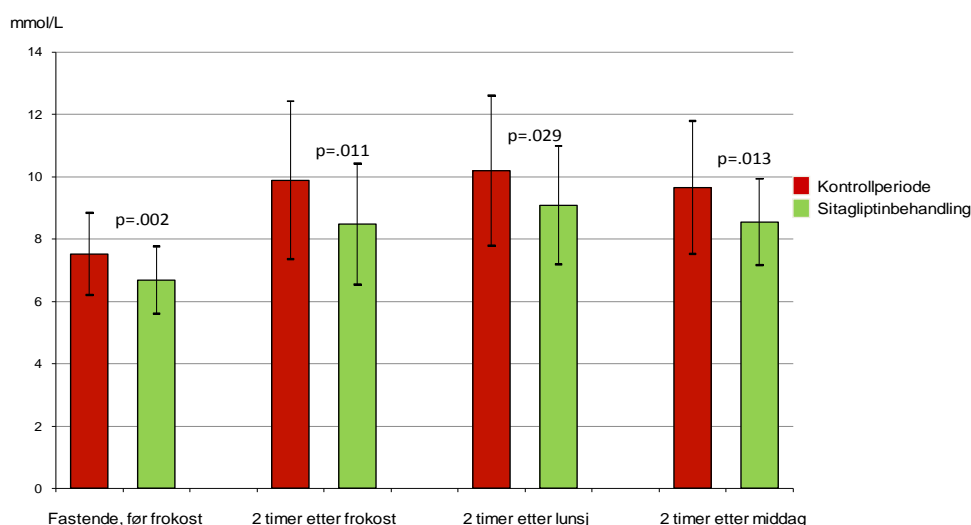
Samtlige pasienter leverte hjemmemålingsskjemaer for begge periodene i studien.

Det var varierende hvor mange målinger som var gjort. De fleste av pasientene meldte at de sjelden spiste kveldsmat, eller ikke var våkne til å foreta måling to timer etter dette måltidet. Dette målepunktet ble dermed fjernet den statistiske analysen.

For en av pasientene ble kun de fastende målingene brukt i analysen, grunnet svært få målinger ved de andre tidspunktene. En pasient spiste ikke lunsj, og har dermed ikke resultater fra dette målepunktet. Målinger to timer etter middag mangler for en pasient den eneperioden, og målepunktet er ekskludert for denne pasienten.

Sitagliptin gav, sammenlignet med kontrollperioden, reduksjon i blodsukker ved alle målepunktene. Reduksjonen i blodukker (mmol/L) var 0,83, 1,4, 1,3 og 1,1, ved målepunktene fastende før frokost, 2t etter frokost, 2t etter lunsj og 2t etter middag.

Disse resultatene var alle statistisk signifikante. Se figur 3.5.



Figur 3.5. Hjemmemåling av blodsukker. Gjennomsnitt av de fjorten siste dagene i hver av de to periodene.

3.7 Analyse av NO

NO- resultater for en av undersøkelsesdagedagene, manglet for en pasient. Denne pasienten ble derfor ekskludert fra denne analysen. Median NO- konsentrasjon ved baseline, etter kontrollperioden og etter sitagliptin- behandling var henholdsvis; 46, 8 (41,4, 57,0), 40,3 (33,9, 52,56) og 43,8 (39,0, 47,4) $\mu\text{mol/ L}$. Sitagliptinbehandling gav, sammenlignet med baseline, en median endring i NO- konsentrasjon på - 6.424 (-9,5, 5,4) $\mu\text{mol/ L}$. Denne reduksjonen i NO- konsentrasjon etter sitagliptinbehandling viste seg ikke å være statistisk signifikant sammenlignet med kontrollperioden målt mot baseline ($p= 0, 657$).

3.8 Mikrovaskulær endotelfunksjon

Peak_{ACh} og AUC_{ACh} ble ikke målt på en av pasientene den ene undersøkelsesdagen, grunnet feil på iontoforesestrømmen. PORH ble ikke utført på to av pasientene ved

baseline, også grunnet tekniske problemer. En pasient ble tatt ut før beregning av resultatene. Årsaken var feil på iontoforesestrømmen ved alle tre undersøkelsesdagene. Dette kan skyldes at pasienten hadde utartet hårvekst på underarmen, hvilket gjorde det vanskelig å finne en gunstig plassering av iontoforesekkammeret. Ingen pasienter oppfylte eksklusjonskriteriet, vedrørende uspesifikk vasodilatasjon. Resultatene viser at gjennomsnittlig økning i AUC_{ACh} og $Peak_{ACh}$ etter behandling med sitagliptin ikke var større enn den gjennomsnittlige forskjellen mellom kontrollperioden og baseline. Den positive endringen i AUC_{Rh} og $Peak_{Rh}$ etter sitagliptin- behandling, var større enn forskjellen mellom kontrollperioden og baseline. Men denne numeriske økningen var ikke signifikant. Se tabell 3.8 og vedlegg 6e. Endringen i hudtemperatur under undersøkelsen var minimal, i gjennomsnitt \pm standardavvik $0,4 \pm 0,3^{\circ}C$, $0,4 \pm 0,7^{\circ}C$ og $0,1 \pm 0,4^{\circ}C$, henholdsvis for undersøkelsene ved baseline, etter kontrollperioden og etter sitagliptinbehandling.

Tabell 3.8: Gjennomsnitt \pm standardavvik forandring i endotelfunksjon etter sitagliptinbehandling og kontrollperioden.

Parametere	Δ sitagliptin- behandling vs baseline	Δ kontrollperiode vs baseline	p- verdi
AUC_{ACh} (AUmin)	27.3 ± 347.0	56.1 ± 243.1	.796
$Peak_{ACh}$ (AU)	22.0 ± 40.2	34.7 ± 68.2	.526
AUC_{Rh} (AUmin)	12.3 ± 34.0	7.2 ± 36.1	.312
$Peak_{Rh}$ (AU)	2.9 ± 42.5	$.3 \pm 39.0$.321

3.9 Urin

En pasient hadde sterkt utslag for proteiner (3+) ved måling med urinstix ved baseline, men ingen utslag etter kontrollperiode og sitagliptin- behandling. En pasient hadde relativt sterkt utslag (2+) for proteiner ved baseline og etter kontrollperioden. Dette hadde økt (3+) etter sitagliptin- behandlingen.

3.10 Blodtrykk

Det ble ikke funnet signifikante endringer i blodtrykk under studien.

3.11 Compliance

Compliance ble kontrollert ved tablettelling. En pasient leverte ikke tilbake tablettesken (Januvia®, tabletter) etter endt behandling. Denne pasienten rapporterte å ha glemt en tablett. For en pasient manglet det 3 tabletter i forhold til det som var beregnet overskudd for behandlingsperioden. Pasienten hevder selv å ha fulgt korrekt dosering, og har mistet disse tablettene. For de resterende pasientene viste tablettellingen 100 % compliance.

3.12 Bivirkninger

Sitagliptin var generelt svært godt tolerert av pasientene i studien. En pasient ble tatt ut av studien grunner mulige bivirkninger. Pasienten var i studieperioden med aktiv behandling, ½ tablett daglig (50 mg sitagliptin), da hun opplevde nattesvette uten at dette skyldtes hypoglykemi. Sitagliptin ble seponert og symptomene forsvant. Det ble gjort et nytt forsøk med sitagliptin- behandling, men da symptomene gjenoppstod ble hun tatt ut av studien. Ellers rapporterte ingen av studiedeltagerene om symptomer som kan relateres til sitagliptinbehandling. Som nevnt fant man ingen unormale funn i de biokjemiske analysene. Totalt ble det registrert to hypoglykemiske episoder i hjemmemålingsskjemaene. Den ene var en fastende

plasmaglukose på 2.8 mmol/L hos en pasient i perioden med sitagliptin- behandling. Den andre var en tilleggsmåling, der pasienten våknet med følingssymptomer. Plasmaglukose var da 3.3 mmol/L. Det siste tilfelle skyldes trolig alkoholinntak kvelden før. Begge disse pasientene ble også behandlet med glipizid.

4. Diskusjon

Studien viser at sitagliptin reduserer både fastende, og postprandialt plasmaglukose. Sitagliptin var godt tolerert og påvirket ikke konsentrasjonen av immunosuppressive legemidler i blodet, eller andre biokjemiske parametre. Studien kan ikke bevise effekt på endotelfunksjonen av sitagliptin.

Insulin og plasmaglukose

Sitagliptin har en moderat blodsukkersenkende effekt, sammenlignet med for eksempel sulfonylurea eller metformin. Studier har vist en gjennomsnittlig reduksjon i HbA1c på 0,28 % - 0,26 % [77], men opptil 0,6-1 % når HbA1c er høyere enn 9 % [78]. Vår studie var ikke av lang nok varighet til å kunne vurdere effekt på HbA1c, da denne parameteren gir et mål på gjennomsnittlig glukosekonsentrasjon de sist 6-8 ukene. Men funnene fra OGTT er i tråd med funn i andre studier.

Glukosebelastningen viste signifikant reduksjon i plasmaglukose, både ved 0 og 120 minutter, etter fire uker med sitagliptinbehandling. Sitagliptin øker inkretineffekten ved inhibering av enzymet DPP-IV, som bryter ned inkretin-peptidene (først og fremst GLP-1). GLP-1 frigjøres som respons på karbohydratinntak, og forsterker insulinfrigjøringen fra beta-cellene og senker glukagon-frigjøringen fra alfa-cellene. Begge deler gir lavere blodsukker. GLP-1 nivåene er vanskelige å måle, og dette ble ikke gjort i denne studien. Hos normoglykemiske personer er inkretineffekten først og fremst en post prandial effekt. Men personer med diabetes har kronisk hyperglykemi, og det er derfor ikke uventet at sitagliptin også reduserer fastende plasmaglukose. Det var utfordrende å finne pasienter som passet inklusjonskriteriene, og studiedeltagerene var generelt moderat hyperglykemiske. Dersom pasientene hadde hatt en høyere gjennomsnittlig HbA1c, kunne man forventet en større relativ effekt av sitagliptin [79]. Hjemmemålingene bekrefter resultatene fra glukosebelastningen, og blodsukkeret ble signifikant lavere med sitagliptin ved alle målepunktene.

Hjemmemåling av blodsukker er en metode med begrensninger. Det var varierende hvor mange målinger som ble utført av de enkelte pasientene. Og nøyaktigheten i

Diskusjon

resultatene avhenger av at pasientene måler relativt nøyaktig to timer etter måltidene. Alle pasientene fikk utdelt et glukometer til hjemmebruk av samme type. Det ble gitt opplæring i bruken av apparatet, og testet av den enkelte pasienten kunne bruke det. Det er samsvar mellom resultatene fra OGGT og hjemmemåling, dette tyder på at hjemmemålingene er korrekt utført.

Det kunne ikke beregnes insulinsekresjon for alle pasientene i studien, grunnet manglende data. Resultatene fra kun seks, av tolv, pasienter ble tatt med i den statistiske analysen. Dette er antakelig grunnen til at det ikke er noen statistisk signifikant økning i insulinsekresjon ved sitagliptinbehandling. For første fase insulinsekresjon var gjennomsnittlig endring, med sitagliptinbehandling fra baseline, mindre enn forskjellen mellom resultatene fra kontrollgruppen og baseline. Andre fase insulinsekresjon var større etter perioden med aktiv behandling enn etter kontrollperioden, men forskjellen var ikke signifikant. Ved korreksjon for plasmaglukose ble økningen i insulinsekresjon større, men ikke signifikant. Dette skyldes antagelig det lave antallet pasienter.

Insulinsensitiviteten (ISI_{tx}) ble ikke endret med sitagliptinbehandling i denne studien. Dette er heller ikke vist tidligere, selv om en studie indikerer en svak, ikke-signifikant, økning i insulinsensitivitet [80].

CPGCR

CPGCR (C- peptide til glukose, kreatinin ratio) ble beregnet ut i fra fastende verdier for C- peptid, plasmaglukose og kreatinin. C- peptid utskilles i ekvimolare mengder med insulin, og er et godt surrogatmål på insulinkonsentrasjon. CPGC- ratioen korrigerer for nyrefunksjonen, og er derfor et bedre mål for C-peptid frigjøring i en gruppe pasienter med forskjellig nyrefunksjon. CPGCR var 14% høyere etter sitagliptin- behandling, og økningen var signifikant, dette kan indikere en bedret β -celle funksjon.

Mikrovaskulær endotelfunksjon

Endotelavhengig og total mikrovaskulær endotelfunksjon ble undersøkt ved laser Doppler flowmetry kombinert med iontoforetisk administrasjon av ACh over huden og postokkulsiv reaktiv hyperemi. Fordelene med metoden er at den er non- invasiv og gir en kontinuerlig måling av blodgjennomstrømningen i måleområdet. Men metoden har også begrensninger. Blodgjennomstrømningen måles kun på et svært begrenset område, og forskjell i sirkulasjonen i nærliggende områder kan være stor. Metoden er også følsom for variasjon i hudtemperatur og bevegelser i arm og fingre. Dette må monitoreres, og tas hensyn til ved avlesning av resultatene. Blodsukker, inntak av mat og drikke, vil også kunne påvirke undersøkelsen. Det er viktig at undersøkelsen gjennomføres under standardiserte forhold. Undersøkelsen ble gjennomført under tilnærmet like forhold ved alle tre undersøkelsesdagene. Laser Doppler- undersøkelsen startet etter OGTT var gjennomført og pasienten hadde inntatt frokost og medisiner. Se tabell 2.1. Pasienten lå i en seng gjennom hele undersøkelsen, og kom til ro før oppstart. Romtemperaturen ble også monitorert, og endringen var ubetydelig. Til tross for standardiserte betingelser, har metoden vist å ha stor variasjonskoeffesient [74].

Både AUC_{rh} og $Peak_{rh}$ var nummerisk større etter sitagliptin-behandling enn etter kontrollperioden, begge sammenlignet med baseline. Men økningen var ikke statistisk signifikant. Studien viste ingen effekt av sitagliptin på ACh- respons. Forskjellen i AUC_{ACh} ved baseline og etter kontrollperioden var større enn endringen etter sitagliptinbehandling. Det samme gjaldt resultatene for og $Peak_{ACh}$. Årsakene kan være begrensningene ved metoden, det lave antall pasienter, eller at sitagliptinbehandling ikke har noen effekt på mikrovaskulær endotelfunksjon

Analyse av NO

NO- analysen viste ingen effekt av sitagliptin på konsentrasjonen av NO i blodet, vi hadde heller ingen hypotese rundt dette. Analysen ble utført for å se disse resultatene

Diskusjon

i sammenheng med resultatene fra Laser Doppler- undersøkelsen. Funnene fra de to undersøkelsene er sammenfallende.

Blodtrykk

Sitagliptin- behandling gav ingen reduksjon i blodtrykk under studien. I en studie av ikke- diabetiske pasienter med moderat hypertensjon gav sitagliptin en moderat, men signifikant, nedgang i blodtrykk [81]. Funnene våre var likevel som forventet da bevisene for en blodtrykkssenkende effekt av sitagliptin er svake og det var relativt få studieobjekter i vår studie.

Sikkerhetsprofil

Sitagliptin var generelt godt tolerert. Dette samsvarer med andre studier gjort på sikkerheten av legemiddelet [55, 82, 83]. Kun en pasient avbrøt behandlingen grunnet symptomer som antagelig kunne relateres til behandlingen. Pasienten opplevde nattesvette, uten at det skyltes hypoglykemi. En av fordelene med sitagliptin er at risikoen for hypoglykemi er liten [55]. Dette bekreftes også i denne studien. De to tilfellene av hypoglykemi registrert i hjemmemålingene, skyldes antakelig ikke sitagliptin. Det ene tilfellet var hos en pasient som i tillegg til sitagliptin ble behandlet med glipirid. Og tilfellet oppstod på natten etter alkoholinntak. Det andre tilfellet var ved en fastende måling, som antagelig skyldes lang tid siden forrige måltid. Denne pasienten ble også behandlet med glipirid i tillegg til sitagliptin.

Sitagliptin er hittil ikke vist å ha klinisk relevante interaksjoner med andre legemidler. Årsaken er antagelig at virkestoffet i liten grad er utsatt for hepatisk metabolisme [59- 62, 65]. Heller ikke i denne studien mistenkes interaksjonsproblematikk. Sitagliptin påvirket ikke konsentrasjonen av immunsuppressive legemidler i blodet.

Diskusjon

De fleste biokjemiske parametere forble uendret etter sitagliptin- behandlingen. De numeriske økningene i urinsyre, urea, kreatinin og estimert GFR var ikke signifikante. Økt forekomst av nasofyringitt er observert ved sitagliptin- behandling i enkelte studier [82]. Bevisene for dette er svake, men dersom det er en sammenheng, er det absolutt relevant ved bruk av sitagliptin hos immunsupprimerte pasienter. Det ble ikke registrert noen tilfeller av slike infeksjoner i vår studie.

Dosejustering av sitagliptin er anbefalt ved moderat nyresvikt [63]. Disse anbefalingene ble fulgt i studien, og pasienter med estimert GFR <50 (mL/min/1.73m²) fikk 50 mg sitagliptin/dag. Dette gjaldt tre av pasientene i studien. Anbefalingen om dosejusteringen virker fornuftig. Sitagliptin var godt tolerert og hadde tilsvarende effekt hos disse, som standarddose hadde hos pasientene med estimert GFR >50 (mL/min/1.73m²).

Begrensninger

Studien har flere begrensninger. For det første er det en relativt liten studie, både i antall pasienter og i varighet. En annen svakhet ved studien er at den ikke er placebokontrollert. Pasientene ble randomisert til å begynne med eller uten aktiv behandling. Randomiseringen styrker designet ved å avsløre eventuell ”regression towards the mean”. Altså det statistiske fenomenet at variabler som er ekstreme ved første måling, vil normalisere seg ved senere målinger. Figur 3.2 viser at dette ikke syntes å være tilfelle i denne studien, da det ikke er noen relevant forskjell mellom pasientene som starter med, eller uten, sitagliptin. En annen begrensning ved studien at deltagerne hadde relativt lave plasmaglukoseverdier. Som nevnt, ville man antagelig sett en større effekt på plasmaglukose, dersom pasientene hadde hatt en høyere gjennomsnittlig HbA1c.

Diskusjon

Konklusjon

Etter det vi har kjennskap til, er dette den første studien hvor sitagliptin utprøves på nyretransplanterte pasienter. Funnene i denne pilotstudien indikerer at sitagliptin er effektivt og trygt å bruke for nyretransplanterte pasienter med diabetes mellitus, som ikke krever insulinbehandling. Selv om studien ikke finner grunnlag for å tro at sitagliptin påvirker nyrefunksjonen, eller den immunsuppressive behandlingen, er det behov for studier med flere pasienter og lengre varighet.

Kildeliste

1. Hartmann, A., T. Jenssen, and J. Julsrud, *Nyremedisin- en praktisk veileder*. Second ed. 2008, Oslo: Gyldendal Akademisk.
2. Norsk Nyremedisinsk Forening, *ANNUAL REPORT 2007 The Norwegian Renal Registry*. 2007 [cited 2009 01.10]; Available from: <http://www.nephro.no/nnr/AARSM2007.pdf>.
3. Norsk Nyremedisinsk Forening, *PROTOKOLL FOR NYRE-TRANSPLANTASJON OG PANCREAS-TRANSPLANTASJON*. 2008. [cited 2009 01.10]; Available from: <http://www.nephro.no/foreningsnytt/Tx-Protokoll-total-2008.pdf>
4. WHO, *Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications, Report of a WHO Consultation Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus* 1999 [cited 2009.22.09]; Available from: http://www.staff.ncl.ac.uk/philip.home/who_dmc.htm.
5. WHO. *Diabetes*. [cited 2009.22.09]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.
6. Hjelmæsæth, J. and K. Midttvedt. *F5 Diabetes mellitus etter transplantasjon*. 2005 [cited 2009.11.09]; Available from: <http://www.legeforeningen.no/id/66768>.
7. Hjelmæsæth, J., T. Jenssen, and A. Hartmann, *Diagnosing PTDM*. Transplantation, 2003. **75**(10): p. 1761.
8. Montori, V.M., et al., *Posttransplantation diabetes: a systematic review of the literature*. Diabetes Care, 2002. **25**(3): p. 583-92.
9. Kasiske, B.L., et al., *Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States*. Am J Transplant, 2003. **3**(2): p. 178-85.

-
10. Roland, M., et al., *Immunosuppressive medications, clinical and metabolic parameters in new-onset diabetes mellitus after kidney transplantation*. *Transpl Int*, 2008. **21**(6): p. 523-30.
 11. Valderhaug, T.G., et al., *Reduced incidence of new-onset posttransplantation diabetes mellitus during the last decade*. *Transplantation*, 2007. **84**(9): p. 1125-30.
 12. Hagen, M., et al., *A 6-year prospective study on new onset diabetes mellitus, insulin release and insulin sensitivity in renal transplant recipients*. *Nephrol Dial Transplant*, 2003. **18**(10): p. 2154-9.
 13. Hjelmessaeth, J., et al., *New-onset posttransplantation diabetes mellitus: insulin resistance or insulinopenia? Impact of immunosuppressive drugs, cytomegalovirus and hepatitis C virus infection*. *Curr Diabetes Rev*, 2005. **1**(1): p. 1-10.
 14. Hjelmessaeth, J., et al., *GLUCOSE INTOLERANCE AFTER RENAL TRANSPLANTATION DEPENDS UPON PREDNISOLONE DOSE AND RECIPIENT AGE I*. *Transplantation*, 1997. **64**(7): p. 979-983.
 15. Shah, T., et al., *Risk Factors for Development of New-Onset Diabetes Mellitus After Kidney Transplantation*. [Miscellaneous Article].
 16. Hartmann, A., S. Sagedal, and J. Hjelmessaeth, *The natural course of cytomegalovirus infection and disease in renal transplant recipients*. *Transplantation*, 2006. **82**(2 Suppl): p. S15-7.
 17. Hjelmessaeth, J., et al., *Is there a link between cytomegalovirus infection and new-onset posttransplantation diabetes mellitus? Potential mechanisms of virus induced beta-cell damage*. *Nephrol Dial Transplant*, 2005. **20**(11): p. 2311-5.
 18. Fabrizi, F., et al., *Post-Transplant Diabetes Mellitus and HCV Seropositive Status After Renal Transplantation: Meta-Analysis of Clinical Studies*. *American Journal of Transplantation*, 2005. **5**(10): p. 2433-2440.

-
19. Ghisdal, L., et al., *TCF7L2 Polymorphism Associates with New-Onset Diabetes after Transplantation*. J Am Soc Nephrol, 2009.
 20. Van Laecke, S., et al., *Posttransplantation hypomagnesemia and its relation with immunosuppression as predictors of new-onset diabetes after transplantation*. Am J Transplant, 2009. **9**(9): p. 2140-9.
 21. Vincenti, F., et al., *Results of an international, randomized trial comparing glucose metabolism disorders and outcome with cyclosporine versus tacrolimus*. Am J Transplant, 2007. **7**(6): p. 1506-14.
 22. Markell, M., *New-onset diabetes mellitus in transplant patients: pathogenesis, complications, and management*. Am J Kidney Dis, 2004. **43**(6): p. 953-65.
 23. Pavlakis, M. and A.S. Goldfarb-Rumyantzev, *Diabetes after transplantation and sirolimus: what's the connection?* J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(7): p. 1255-6.
 24. Teutonico, A., P.F. Schena, and S. Di Paolo, *Glucose metabolism in renal transplant recipients: effect of calcineurin inhibitor withdrawal and conversion to sirolimus*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(10): p. 3128-35.
 25. Johnston, O., et al., *Sirolimus is associated with new-onset diabetes in kidney transplant recipients*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(7): p. 1411-8.
 26. Aasebo, W., et al., *Impaired glucose homeostasis in renal transplant recipients receiving basiliximab*. Nephrol Dial Transplant, 2009.
 27. Andrews, R.C. and B.R. Walker, *Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets*. Clin. Sci., 1999. **96**(5): p. 513-523.
 28. Henriksen, J.E., et al., *Risk and mechanism of dexamethasone-induced deterioration of glucose tolerance in non-diabetic first-degree relatives of NIDDM patients*. Diabetologia, 1997. **40**(12): p. 1439-48.

-
29. Hjelmessaeth, J., et al., *Tapering off prednisolone and cyclosporin the first year after renal transplantation: the effect on glucose tolerance*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16**(4): p. 829-35.
30. Bergrem, H.A., et al., *Role of Prednisolone Pharmacokinetics in Postchallenge Glycemia After Renal Transplantation*. Ther Drug Monit, 2008.
31. Markell, M., *Clinical impact of posttransplant diabetes mellitus*. Transplantation Proceedings, 2001. **33**(5, Supplement 1): p. S19-S22.
32. Hjelmessaeth, J., et al., *The impact of early-diagnosed new-onset post-transplantation diabetes mellitus on survival and major cardiac events*. Kidney Int, 2006. **69**(3): p. 588-95.
33. Cosio, F.G., et al., *Patient survival after renal transplantation: IV. Impact of post-transplant diabetes*. Kidney Int, 2002. **62**(4): p. 1440-6.
34. Helsedirektoratet. *Nasjonale faglige retningslinjer, Diabetes Forebygging, diagnostikk, behandling*. 2009 [cited 2009.11.09]; Available from: http://www.helsedirektoratet.no/vp/multimedia/archive/00113/Diabetes_Forebygg_113609a.PDF.
35. *Statistikk fra reseptregisteret*. 2008 [cited 2009 11.09]; Available from: <http://www.reseptregisteret.no/Prevalens.aspx>.
36. Golay, A., *Metformin and body weight*. Int J Obes, 2007. **32**(1): p. 61-72.
37. Statens legemiddelverk, S. *Preparatomtale (Glucophage 500mg)*. 2008 [cited 2009.10.09]; Available from: http://www.legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch_80333.aspx?SearchID=2e2c00e2-4ffc-4d26-b61c-81d9a93835ec.

-
38. Madsen, S. and T. Holstad. *Metformin og melkesyreforgiftning*. 2009 [cited 2009.13.07; Available from: http://www.legemiddelverket.no/templates/InterPage_80842.aspx.
39. Voytovich, M.H., et al., *Short-term treatment with rosiglitazone improves glucose tolerance, insulin sensitivity and endothelial function in renal transplant recipients*. *Nephrol Dial Transplant*, 2005. **20**(2): p. 413-8.
40. Lindholm, A., et al., *Ischemic heart disease--major cause of death and graft loss after renal transplantation in Scandinavia*. *Transplantation*, 1995. **60**(5): p. 451-7.
41. Foley, R.N., P.S. Parfrey, and M.J. Sarnak, *Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease*. *Am J Kidney Dis*, 1998. **32**(5 Suppl 3): p. S112-9.
42. Shirali, A.C. and M.J. Bia, *Management of Cardiovascular Disease in Renal Transplant Recipients*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2008. **3**(2): p. 491-504.
43. Jardine, A.G., *Assessing the relative risk of cardiovascular disease among renal transplant patients receiving tacrolimus or cyclosporine*. *Transpl Int*, 2005. **18**(4): p. 379-84.
44. Xu J Fau - Zou, M.-H. and M.H. Zou, *Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction*. *Circulation*, 2009. **120**(1524-4539 (Electronic)): p. 1266- 1286.
45. Mark, P.B., et al., *Endothelial dysfunction in renal transplant recipients*. *Transplant Proc*, 2005. **37**(9): p. 3805-7.
46. Tooke, J.E. and M.M. Hannemann, *Adverse endothelial function and the insulin resistance syndrome*. *J Intern Med*, 2000. **247**(4): p. 425-31.

-
47. Morris, S.T., et al., *Endothelial dysfunction in renal transplant recipients maintained on cyclosporine*. *Kidney Int*, 2000. **57**(3): p. 1100-6.
48. Asberg, A., K.J. Berg, and A. Hartmann, *Each administration of cyclosporin A enhances skin microvascular reactivity in renal transplant recipients*. *Microvasc Res*, 2000. **60**(2): p. 81-90.
49. Gautier, J.F., et al., *Biological actions of the incretins GIP and GLP-1 and therapeutic perspectives in patients with type 2 diabetes*. *Diabetes Metab*, 2005. **31**(3 Pt 1): p. 233-42.
50. Drucker, D.J., *The biology of incretin hormones*. *Cell Metabolism*, 2006. **3**(3): p. 153-165.
51. Meier, J.J., *The contribution of incretin hormones to the pathogenesis of type 2 diabetes*. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2009. **23**(4): p. 433-441.
52. Nauck, M., et al., *Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes*. *Diabetologia*, 1986. **29**(1): p. 46-52.
53. Herman, G.A., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of sitagliptin, an inhibitor of dipeptidyl peptidase IV, in healthy subjects: Results from two randomized, double-blind, placebo-controlled studies with single oral doses[ast]*. *Clin Pharmacol Ther*, 2005. **78**(6): p. 675-688.
54. Bergman, A.J., et al., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of multiple oral doses of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-IV inhibitor: a double-blind, randomized, placebo-controlled study in healthy male volunteers*. *Clin Ther*, 2006. **28**(1): p. 55-72.
55. Charbonnel, B., et al., *Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin added to ongoing metformin therapy in patients with type 2*

diabetes inadequately controlled with metformin alone. Diabetes Care, 2006. **29**(12): p. 2638-43.

56. Holz, G.G.t., W.M. Kuhtreiber, and J.F. Habener, *Pancreatic beta-cells are rendered glucose-competent by the insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1(7-37).* Nature, 1993. **361**(6410): p. 362-5.

57. Bergman, A., et al., *Absolute bioavailability of sitagliptin, an oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, in healthy volunteers.* Biopharmaceutics & Drug Disposition, 2007. **28**(6): p. 315-322.

58. Neumiller, J.J., *Differential chemistry (structure), mechanism of action, and pharmacology of GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors.* J Am Pharm Assoc (2003), 2009. **49 Suppl 1**: p. S16-29.

59. Bergman, A.J., et al., *Effect of sitagliptin on the pharmacokinetics of simvastatin.* J Clin Pharmacol, 2009. **49**(4): p. 483-8.

60. Mistry, G.C., et al., *Sitagliptin, an dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, does not alter the pharmacokinetics of the sulphonylurea, glyburide, in healthy subjects.* Br J Clin Pharmacol, 2008. **66**(1): p. 36-42.

61. Mistry, G.C., et al., *Multiple-dose administration of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, does not alter the single-dose pharmacokinetics of rosiglitazone in healthy subjects.* J Clin Pharmacol, 2007. **47**(2): p. 159-64.

62. Wright, D.H., et al., *Multiple doses of sitagliptin, a selective DPP-4 inhibitor, do not meaningfully alter pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin.* J Clin Pharmacol, 2009. **49**(10): p. 1157-67.

63. Bergman, A.J., et al., *Effect of renal insufficiency on the pharmacokinetics of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor.* Diabetes Care, 2007. **30**(7): p. 1862-4.

-
64. Chan, J.C.N., et al., *Safety and efficacy of sitagliptin in patients with type 2 diabetes and chronic renal insufficiency*. Diabetes, Obesity and Metabolism, 2008. **10**(7): p. 545-555.
65. Krishna, R., et al., *Effect of a single cyclosporine dose on the single-dose pharmacokinetics of sitagliptin (MK-0431), a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, in healthy male subjects*. J Clin Pharmacol, 2007. **47**(2): p. 165-74.
66. Tsikas, D., *Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **851**(1-2): p. 51-70.
67. Wiik, L.M., *Langtidsresultater etter simultan nyre- og pankreastransplantasjon hos pasienter med type 1- diabetes*. 2008, UiO: Oslo. p. 33-38.
68. Hills, C.E. and N.J. Brunskill, *Cellular and physiological effects of C-peptide*. Clin Sci (Lond), 2009. **116**(7): p. 565-74.
69. Wahren, J., *C-peptide: new findings and therapeutic implications in diabetes*. Clin Physiol Funct Imaging, 2004. **24**(4): p. 180-9.
70. Hjelmessaeth, J., et al., *Determinants of insulin secretion after renal transplantation*. Metabolism, 2003. **52**(5): p. 573-8.
71. Stumvoll, M., et al., *Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity*. Diabetes Care, 2000. **23**(3): p. 295-301.
72. Tooke, J.E. and G.D.O. Lowe, *A Textbook of vascular medicine*. 1. ed. Vol. 1. 1991, London: Arnold. 659.

-
73. Turner, J., J.J. Belch, and F. Khan, *Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using laser Doppler imaging and iontophoresis*. Trends Cardiovasc Med, 2008. **18**(4): p. 109-16.
74. Asberg, A., et al., *Nonspecific microvascular vasodilation during iontophoresis is attenuated by application of hyperosmolar saline*. Microvasc Res, 1999. **58**(1): p. 41-8.
75. Yvonne-Tee, G.B., et al., *Method optimization on the use of postocclusive hyperemia model to assess microvascular function*. Clin Hemorheol Microcirc, 2008. **38**(2): p. 119-33.
76. de Mul, F.F., et al., *A model for post-occlusive reactive hyperemia as measured with laser-Doppler perfusion monitoring*. IEEE Trans Biomed Eng, 2005. **52**(2): p. 184-90.
77. White, J., *Efficacy and safety of incretin based therapies: clinical trial data*. J Am Pharm Assoc (2003), 2009. **49 Suppl 1**: p. S30-40.
78. Ahren, B., *Clinical results of treating type 2 diabetic patients with sitagliptin, vildagliptin or saxagliptin--diabetes control and potential adverse events*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2009. **23**(4): p. 487-98.
79. Nauck, M.A., et al., *Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, compared with the sulfonylurea, glipizide, in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on metformin alone: a randomized, double-blind, non-inferiority trial*. Diabetes Obes Metab, 2007. **9**(2): p. 194-205.
80. Xu, L., et al., *Effect of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on beta-cell function in patients with type 2 diabetes: a model-based approach*. Diabetes Obes Metab, 2008. **10**(12): p. 1212-20.

-
81. Mistry, G.C., et al., *Effect of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on blood pressure in nondiabetic patients with mild to moderate hypertension*. J Clin Pharmacol, 2008. **48**(5): p. 592-8.
82. Amori, R.E., J. Lau, and A.G. Pittas, *Efficacy and Safety of Incretin Therapy in Type 2 Diabetes: Systematic Review and Meta-analysis*. JAMA, 2007. **298**(2): p. 194-206.
83. Chan, J.C., et al., *Safety and efficacy of sitagliptin in patients with type 2 diabetes and chronic renal insufficiency*. Diabetes Obes Metab, 2008. **10**(7): p. 545-55.

**The effect of sitagliptin treatment on glucose metabolism and endothelial
function in renal transplant recipients**

—

JANUVIA-08

Responsible investigator:

Trond Jenssen, Professor MD, Ph.D, Medical Department, Rikshospitalet Medical Center.

Co-investigators:

Karen Helga Vik, Master grade student (Pharm), Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo.

Anders Hartmann, Professor, MD, Ph.D., Laboratory for Renal Physiology, Medical Department, Rikshospitalet-Radiumhospitalet Medical Center.

Anders Åsberg, Professor, Ph.D., Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo.

Background:

Rikshospitalet-Radiumhospitalet Medical Center is one of the 10 biggest transplant centers in the world. Between 220 and 265 kidney transplants are performed annually and the transplant pool consist of about 2500- 3000 patients in Norway. At present the most challenging task to further improve long-term results in these patients is the increasing cardiovascular morbidity and mortality. A renal transplant patient 30 years of age has approximately the same cardiovascular risk as a 70 years old person in the general population [1]. It has previously been shown that these patients suffer from hypertension, impaired glucose tolerance(IGT)/post transplant diabetes mellitus (PTDM), dyslipidemia as well as endothelial dysfunction [2-8].

Sitagliptin is a dipeptidylpeptidase 4-inhibitor (DPP-4 inhibitor) and increases the levels of the incretin hormones glukagon like peptid-1 (GLP-1) and glucose dependent insulintropic peptid (GIP) since these hormones are hydrolyzed by DPP-4 [9]. The incretin hormones, which is released from the intestinal tract during a meal, regulates the glucose metabolism by increasing the insulin release from beta cells (elevated sensitivity of the beta cells towards glucose) and decreasing glucagon release from alpha cells. This effect seems to be dependent of increased plasma glucose and it is hence decreased risk for hypoglycemia by using drugs that alters the incretin system [9].

Sitagliptin is metabolized both via CYP3A4 as well as CYP2C8 but has not been shown to be an inhibitor of CYP enzymes [10]. Calcineurin inhibitors (cyclosporine, CsA and tacrolimus, Tac) are the corner stones in immunosuppressive regimens around the world. Both CsA and Tac are also metabolized via CYP3A4 and in a small single dose study it has been shown that CsA increases the plasma concentration of sitagliptin slightly [11]. Interaction the other way around is not suspected based on *in vitro* metabolism data.

Ethical considerations:

Renal transplant recipients die prematurely due to cardiovascular disease. A 30 year old transplant recipient has approximately the same cardiovascular risk as a 70 year old person in the general population. It is therefore important to further elucidate on these problems, trying to prevent the development of cardiovascular disease as far as possible. There are several underlying reasons for increased cardiovascular disease following renal transplantation, including diabetes mellitus, and in this study we primarily intend to investigate the effect of treatment with sitagliptin on insulin secretion/sensitivity as well as endothelial function, which both are major risk factors. Renal transplant recipients are treated with life-long immunosuppressive therapy in order to prevent acute rejection episodes. The calcineurin inhibitors (CsA and Tac) are the back-bones in the immunosuppressive treatment and they have a very narrow therapeutic index. It is therefore essential to assure that new drug to be used in transplanted patients do not interact with CsA and Tac. Oral hypoglycemic drugs that have been documented to be safe in combination with these for transplanted patients necessary drugs are glipizide [12], nateglinide [13] and rosiglitazone [14]. Metformin therapy involves the risk of lactic acidosis in patients with reduced renal function and is not used in renal transplant recipients. Even though sitagliptin is metabolized via the same enzyme as CsA and Tac (CYP3A4) previous *in vitro* and *in vivo* studies with relevant probe drugs in healthy volunteers do not indicate the presence of any relevant pharmacokinetic interaction. However, to be absolutely sure that it is safe to administer sitagliptin in transplanted patients blood concentrations of both CsA and Tac will be followed closely during the study.

Rationale

The major cause of premature death in renal transplant recipients is cardiovascular disease. Sitagliptin stimulates insulin secretion and inhibits glucagon release, two

central mechanisms in PTDM by interaction with a hormone system (incretins) that just recently it has become possible to modulate by drugs. Sitagliptin therefore is an interesting additional drug for the treatment of PTDM in transplanted patients.

Present *in vitro* and single dose *in vivo* data also show that sitagliptin does not interact with essential immunosuppressive drugs (CsA and Tac) indicating that it most probably is safe to administer to this patient population.

Study objectives:

The primary objective of the present study is to investigate the effect of sitagliptin on insulin secretion in renal transplant recipients.

Secondary objectives are;

- effect on insulin sensitivity
- effect on fasting blood glucose (measured daily at home)
- effect on endothelial function
- effect on CsA/Tac blood concentrations

Study design:

This is a prospective, open, randomized, controlled, cross-over study. Eligible renal transplant recipients are randomized to either first receive 100 mg sitagliptin per day for 4 weeks followed by a new period of 4 weeks with no treatment or the opposite sequence (no treatment followed by 100 mg sitagliptin). Patients with GFR 25-49 ml/min/1.73 m² will receive sitagliptin 50 mg/ day. Randomization envelopes will be prepared prior to the study by simple randomization and assigned to included patients consecutively. The randomization code will be kept in a closed envelope on the Laboratory for Renal Physiology, Rikshospitalet in order for the code to be broken in case of emergency. All patients should perform a pregnancy test prior to inclusion in

the study. Baseline investigations of insulin secretion/sensitivity, and endothelial function will be performed prior to (but not more than 4 days prior to) first drug administration/no treatment period start. Patients are then treated with either sitagliptin or no treatment for periods of 4 weeks (± 4 days), when the investigations performed at baseline will be repeated. The opposite treatment is then applied for 4 new weeks and the baseline investigations are repeated again after this period. Baseline investigations are not repeated before the second treatment phased. Prednisolone doses are not to be changed during the study. For safety reasons are four safety visits included in the study, one and two weeks after start of each treatment phase. On these visits glucose as well as CsA/Tac concentrations will be monitored and a general physical investigation performed.

Patients

The patients will primarily be recruited from the great-Oslo area and all study visits will be performed at Rikshospitalet. Patients will otherwise follow standard posttransplant procedures at their local hospital during the study period. Patients included in other clinical trials are also eligible for inclusion the present study. In case of current antidiabetic treatment it should be continued without dose adjustments during the study.

Informed consent will be obtained according to the Declaration of Helsinki and GCP. Patients and investigator will sign the patient information which will be kept on file. The patient will receive a copy of the patient information. The patient data will be recorded in Case Report Forms (CRF) and all information will be handled confidentially. Any complications will be recorded.

Inclusion criteria:

- Renal transplant recipient more than 1 year posttransplant with stable renal function (less than 20% deviation in serum creatinine the last 2 months) and stable prednisolone dose for the last 3 months before inclusion.
- Patients in need of (additional) oral anti-diabetic treatment:
 - New onset diabetes patients with fasting plasma glucose 7-8 mmol/ l, and/or 2-hr plasma glucose 12-18 mmol/l after an oral glucose tolerance test (OGTT)
 - Patients already on oral hypoglycemic therapy, but with Hb_{A1c} 8-11%
- > 18 years of age.
- Male patient, or female patient without childbearing potential (surgically sterilized or postmenopausal) or, if female of childbearing potential, is not lactating, has a negative pregnancy test at screening and is willing to utilize an effective method of contraception throughout the study period and for 90 Days following discontinuation of the Study Drugs.
- Signed informed consent.

Exclusion criteria:

- Treatment with insulin
- Severe liver disease.
- Estimated GFR < 25 ml/min/1.73 m².
- Skin disorders that may influence laser Doppler flowmetry investigations.
- Pregnant or nursing mothers.

Study procedures

Oral glucose tolerance test (OGTT, for insulin secretion and sensitivity):

Oral glucose tolerance test; measurements of plasma glucose and serum insulin before, 30 and 120 minutes following orally administration of 75 g glucose.

The C-peptide to glucose, creatinine ratio:

The C-peptide to glucose, creatinine ratio (CPGCR) will be determined from the fasting (basal) plasma glucose and c-peptide, and a simultaneous serum creatinine. This measure accounts for both the dependence of C-peptide secretion on the ambient glucose concentration and the dependence of C-peptide clearance on kidney function. The CPGCR is calculated as $[\text{c-peptide (nmol/L)} * 100] / [\text{glucose (mmol/L)} * \text{creatinine (umol/L)}]$.

Plasma glucose concentrations:

In addition to the plasma glucose concentrations measure at the OGTT investigations each patient will perform, and log, daily fasting plasma glucose concentrations.

Hypoglycemic episodes:

The participants will, on a daily basis, log the number and severity of hypoglycemic episodes.

Endothelial function:

The investigations will be performed by laser Doppler flowmetry in a quiet room at a constant temperature (22-25°C) as earlier described [15]. Patients with an AV-fistula are to be examined on the contralateral arm.

Patients are to be allowed acclimatisation for a period of 20 minutes. Subsequent monitoring of skin blood perfusion started with baseline measurements for 5 minutes, followed by four consecutive 6 minutes periods after each charge given. The iontophoresis protocol consisted of; 0.50 mC (50 μ A for 10 seconds), 0.75 mC (75 μ A for 10 seconds), 1.0 mC (100 μ A for 10 seconds) and 1.5 mC (150 μ A for 10 seconds).

A postocclusive reactive hyperemia test is to be performed following a new acclimatisation period of 5 minutes and 5 minutes baseline measurement. The forearm blood flow was occluded for 3 minutes with a suprasystolic cuff pressure of 280 mmHg, followed by instant release of the occlusion.

A plasma sample (4 mL EDTA vacutainer) for the determination of NO concentrations will be drawn prior to the investigation.

Calcineurin blood concentrations:

Whole-blood and plasma samples (3 mL EDTA vacutainer tubes) for determination of whole-blood CsA (C2) or Tac (C0) concentration will be taken in according to standard procedures on the weekly visits.

Clinical information

Demographic data of the included patients should be registered in CRF's; age, height, weight, concomitant drugs and other potential cofactors that might affect the results.

Any adverse events will also be recorded in the CRF and reported in according to guidelines. SUSARs will be reported in paper form on standard CIOMS-forms.

Compliance

Compliance issues are not expected in this patient population. However, compliance will be assured by tablet counting after each treatment phase.

Laboratory methods:

Plasma glucose concentrations are measured by a plasma calibrated HemocureABTM B-glucose Analyser.

Serum insulin is analyzed in two parallels with Immulite Insulin kit on the Immulite 2000 platform.

Serum C-peptide is analyzed in two parallels with Immulite C-Peptide kit on the Immulite 2000 platform.

Total NO (nitric oxide) activity was determined as plasma nitrite and nitrate concentrations using a total NO assay (R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, UK). All sample nitrate is enzymatically converted to nitrite by nitrate reductase followed by colorimetric nitrite determination of a colored azo dye product of the Griess reaction.

CsA and Tac concentrations will be performed as standard analyses at the Department of Medical Biochemistry, Rikshospitalet.

Withdrawals:

Premature discontinuation of treatment will significantly lower the power of the study and patients should therefore attempt to remain on treatment unless there are compelling reasons for discontinuation.

Patients will be withdrawn from the study in case of potentially Study drug related adverse events (gastrointestinal, nasopharyngitis, severe hypoglycemia). Severe hypoglycemia is defined as plasma glucose < 2.0 mmol/L, unconsciousness or the need of assistance from other persons. Moderate hypoglycemia (plasma glucose between 2.0 and 3.9 mmol/L) will primarily result in dose reduction of the Study drug.

Patients are at all time free to express their wish to withdraw.

Information to study personnel

All involved study personnel will receive the full study protocol and they will in addition be informed on a start-up meeting about the study procedures. Any changes during the study will be distributed by the principal investigator via e-mail to all involved study personnel.

Calculations

Insulin sensitivity index for transplanted (ISI_{Tx}) is calculated as $ISI_{Tx} = 0.208 - 0.0032 * BMI - 0.0000645 * Ins_{120} - 0.00375 * Gluc_{120}$.

Insulin secretion is estimated by the Stumvoll algorithms; $Secr_{1,phase} = 1.283 + 1.829 * Ins_{30} - 138.7 * Gluc_{30} + 3.772 * Ins_0$ and $Secr_{2,phase} = 287 + 0.4164 * Ins_{30} - 26.07 * Gluc_{30} + 0.9226 * Ins_0$ [Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W, *et al.* Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000; 23: 295-301]

Endothelial function is to be estimated from two parameters, both the AUC_{ACh} and AUC_{rh} which is the area under the curve for 6 minutes following the 4th stimulation with acetylcholine (ACh) and until flux is back to baseline following the reactive hyperemia test, respectively [15].

Statistical considerations

Number of patients

Based on the assumption that sitagliptin induce a 25% \pm 20% larger change in insulin secretion during the 4 week of treatment as compared with no treatment [16, 17] ten patients are needed to assure a power of 80% at a 5% significance level. Four patients are added to the sample size to cover uncertainties in the calculations and possible drop-outs. In a total fourteen patients will be included.

Formula for total sample-size calculation:

$$n = \frac{2 \times SD^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2} \times 7.9$$

Analysis plan:

All metabolic parameters will be analysed as difference in change from baseline to the end of respective treatment period and the changes will be compared. Data are to be analysed with paired parametric statistical methods as long as they are normally distributed or can be converted to normal distribution by log, or other appropriate, transformation.

Study drug

The study drug will be labeled with the following information (patients with $\text{GFR} \geq 50$ ml/min/1.73m²):

Til klinisk utprøvning

JANUVIA-08 study

Hovedutprøver: Professor Trond Jenssen, Rikshospitalet. Tlf: 23 07 00 00

Pasient nr:

Pasient initialer:

Dato utlevert:

Januvia[®] (sitagliptin) 100 mg tabletter

1 tablett før frokost hver morgen.

Utløpsdato:

Batchnummer:

Oppbevares i romtemperatur

Oppbevares utilgjengelig for barn

Patients with GFR 25-49 ml/min/1.73m²:

Til klinisk utprøvnig

JANUVIA-08 study

Hovedutprøver: Professor Trond Jenssen, Rikshospitalet. Tlf: 23 07 00 00

Pasient nr:

Pasient initialer:

Dato utlevert:

Januvia[®] (sitagliptin) 100 mg tabletter

1/2 tablett før frokost hver morgen.

Utløpsdato:

Batchnummer:

Oppbevares i romtemperatur

Oppbevares utilgjengelig for barn

Vedlegg

Study drug administration will be performed in cooperation with the Pharmacy at Rikshospitalet.

Study duration

Each transplanted patient will be followed for 8 weeks.

First patient in: Q2 2008.

Anticipated recruitment time: 6 months.

Last patient out: Q1 2009

Insurance

The patients are insured according to Act of Product Responsibility.

References

1. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998; 32:S112-119.
2. Hjelmestaeth J, Hartmann A, Kofstad J, Stenstrom J, Leivestad T, Egeland T, Fauchald P. Glucose intolerance after renal transplantation depends upon prednisolone dose and recipient age. *Transplantation* 1997; 64:979-983.
3. Hjelmestaeth J, Hartmann A, Leivestad T, Holdaas H, Sagedal S, Olstad M, Jenssen T. The impact of early-diagnosed new-onset post-transplantation diabetes mellitus on survival and major cardiac events. *Kidney Int* 2006; 69:588-595.
4. Hjelmestaeth J, Midtvedt K, Jenssen T, Hartmann A. Insulin resistance after renal transplantation: impact of immunosuppressive and antihypertensive therapy. *Diabetes Care* 2001; 24:2121-2126.
5. Hausberg M, Kisters K, Kosch M, Rahn KH, Barenbrock M. Flow-mediated vasodilation and distensibility of the brachial artery in renal allograft recipients. *Kidney Int* 1999; 55:1104-1110.
6. Åsberg A, Berg KJ, Hartmann A. Each administration of cyclosporin A enhances skin microvascular reactivity in renal transplant recipients. *Microvasc Res* 2000; 60:81-90.

7. Midtvedt K, Hartmann A, Foss A, Fauchald P, Nordal KP, Rootwelt K, Holdaas H. Sustained improvement of renal graft function for two years in hypertensive renal transplant recipients treated with nifedipine as compared to lisinopril. *Transplantation* 2001; 72:1787-1792.
8. Holdaas H, Fellström B, Jardine AG, Holme I, Nyberg G, Fauchald P, Grönhagen-Riska C, Madsen S, Neumayer HH, Cole E, Maes B, Ambuhl P, Olsson AG, Hartmann A, Solbu DO, Pedersen TR. Effect of fluvastatin on cardiac outcomes in renal transplant recipients: a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 361:2024-2031.
9. McIntosh CH. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors and diabetes therapy. *Front Biosci* 2008; 13:1753-1773.
10. Mistry GC, Bergman AJ, Luo WL, Cilissen C, Haazen W, Davies MJ, Gottesdiener KM, Wagner JA, Herman GA. Multiple-dose administration of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, does not alter the single-dose pharmacokinetics of rosiglitazone in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 2007; 47:159-164.
11. Krishna R, Bergman A, Larson P, Cote J, Lasseter K, Dilzer S, Wang A, Zeng W, Chen L, Wagner J, Herman G. Effect of a single cyclosporine dose on the single-dose pharmacokinetics of sitagliptin (MK-0431), a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, in healthy male subjects. *J Clin Pharmacol* 2007; 47:165-174.

12. Sagedal S, Åsberg A, Hartmann A, Bergan S, Berg KJ. Glipizide treatment of post-transplant diabetes does not interfere with cyclosporine pharmacokinetics in renal allograft recipients. *Clin Transplant* 1998; 12:553-556.
13. Voytovich MH, Haukereid C, Hjelmæsæth J, Hartmann A, Løvik A, Jenssen T. Nateglinide improves postprandial hyperglycemia and insulin secretion in renal transplant recipients. *Clin Transplant* 2007; 21:246-251.
14. Voytovich MH, Simonsen C, Jenssen T, Hjelmæsæth J, Åsberg A, Hartmann A. Short-term treatment with rosiglitazone improves glucose tolerance, insulin sensitivity and endothelial function in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:413-418.
15. Åsberg A, Hartmann A, Fjeldså E, Holdaas H. Atorvastatin improves endothelial function in renal-transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:1920-1924.
16. Charbonnel B, Karasik A, Liu J, Wu M, Meininger G. Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin added to ongoing metformin therapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin alone. *Diabetes Care* 2006; 29:2638-2643.
17. Raz I, Hanefeld M, Xu L, Caria C, Williams-Herman D, Khatami H. Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2006; 49:2564-2571.



UNIVERSITETET I OSLO
DET MEDISINSKE FAKULTET

Professor Trond Jenssen
Medisinsk avd.
Rikshospitalet
0027 Oslo

Regional komité for medisinsk og helsefaglig
forskningsetikk Sør-Øst D (REK Sør-Øst D)
Postboks 1130 Blindern
NO-0318 Oslo

Dato: 30.07.08
Deres ref.:
Vår ref.: 08/280d, 2008/9415

Telefon: 22 85 05 93
Telefaks: 22 85 05 90
E-post: i.m.middelthon@medisin.uio.no
Nettadresse: www.etikkom.no

**Effekten av sitagliptinbehandling på glukosemetabolisme og endotelfunksjon hos
nyretransplanterte pasienter.
Søknad om opprettelse av forskningsbiobank**

Vi viser til svar på merknader av 17.06.08 med følgende vedlegg: Revidert protokoll
versjon 2, revidert protokoll versjon 2 med markerte endringer, revidert informasjonsskriv
versjon 2, revidert informasjonsskriv versjon 2 med markerte endringer.

Komiteen behandlet søknaden 19.05.2008. Prosjektet er vurdert etter lov om behandling av
etikk og redelighet i forskning av 30. juni 2006, jfr. Kunnskapsdepartementets forskrift av
8. juni 2007 og retningslinjer av 27. juni 2007 for de regionale komiteer for medisinsk og
helsefaglig forskningsetikk.


Komiteen finner svarene tilfredsstillende.

Komiteen har ingen innvendinger mot opprettelse av forskningsbiobank og videresender
søknaden om opprettelse av denne sammen med kopi av dette vedtaket til Helsedirektoratet
for endelig godkjenning.

Vedtak:
Prosjektet godkjennes slik det nå foreligger.

Med vennlig hilsen

Stein A. Evensen (sign.)
Professor dr.med.
Leder


Ingrid Middelthon
Komitésekretær



Rikshospitalet
Professor Trond Jenssen
Medisinsk avdeling
0027 OSLO

Deres ref.:
Saksbehandler: BEB
Vår ref.: 08/8409
Dato: 03.10.2008

Universitetet i Oslo - Farmasøytisk institutt - Oversender søknad om opprettelse av forskningsbiobank - Effekten av sitagliptinbehandling på glukosemetabolisme og endotelfunksjon hos nyretransplanterte pasienter

Vi viser til brev vedrørende ovennevnte. Helsedirektoratet er delegert å vurdere meldinger om opprettelse av forskningsbiobanker i henhold til biobankloven § 4.

Direktoratet har ingen innsigelser til at forskningsbiobanken opprettes i henhold til biobankloven.

Direktoratet forutsetter at opprettelsen av den planlagte forskningsbiobanken oppfyller nødvendige krav til godkjenning, konsesjon m.v. i henhold til annet relevant regelverk, herunder bioteknologiloven, helseregisterloven og legemiddelloven.

Melding om forskningsbiobank vil registreres ved Biobankregisteret ved Nasjonalt folkehelseinstitutt som har fått ansvaret for å føre et offentlig tilgjengelig register over landets biobanker, jf biobankloven § 6.

Vennlig hilsen

Ragnhild Castberg e.f.
avdelingsdirektør

Bente Bryhn
rådgiver

Dokumentet er godkjent elektronisk

Kopi: REK Sør-Øst D, ref. 08/280d, 2008/9415
Biobankregisteret, ref. 2311
Anders Åsberg, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo, Postbok 1068 Blindern,
0316 Oslo

Helsedirektoratet Divisjon spesialisthelsetjenester

Avd. bioteknologi og generelle helselover
Bente Bryhn, tlf.: 24 16 32 73

Postadr: Pb 7000 St. Olavs plass, 0130 Oslo • Besøksadr: Universitetsgata 2 • Tlf.: 810 20 050
Faks: 24 16 30 01 • Org. nr.: 983 544 622 • postmottak@helsedir.no • www.helsedirektoratet.no

Forespørsel om deltakelse i legemiddelutprøving

"Effekten av sitagliptinbehandling på glukosemetabolisme og endotelfunksjon hos nyretransplanterte pasienter"

Bakgrunn og hensikt

Dette er en forespørsel til deg som er nyretransplantert om å delta i et forskningsprosjekt som innebærer utprøving av legemiddelet: sitagliptin (Januvia®). Mange nyretransplanterte pasienter utvikler diabetes etter transplantasjon, til dels på grunn av de immundempende legemidlene som brukes for å hindre at den nye nyren avstøtes. Sitagliptin er et nytt legemiddel som øker utskillelsen av insulin fra pankreas. Hensikten med denne studien er å undersøke hvordan sitagliptin virker hos nyretransplanterte pasienter som også bruker immundempende legemidler. Vi ønsker også å undersøke hvordan denne behandlingen indirekte påvirker blodkarenes evne til å trekke seg sammen da vi tidligere har sett at det kan være en link mellom det og insulinfølsomheten hos transplanterte pasienter. Studien er en nasjonal studie som leger ved Rikshospitalet har tatt initiativ til, i samarbeid med forskere ved Farmasøytisk institutt ved Universitetet i Oslo.

Hva innebærer studien?

Studien omfatter 2 perioder à 4 uker, hvor du vil få aktivt legemiddel (sitagliptin) i en periode og ingen behandling i en periode. Hvis du er kvinne og er i fertil alder må du bruke sikker prevensjon under, og inntil 90 dager etter, studien. Hvis du er gravid, eller ammer kan du ikke delta i studien. Hvis du bruker, eller under studien begynner å bruke helsekostpreparater, naturmidler eller legemidler som er forskrevet fra en lege som ikke er din faste nefrolog må du si fra til studielegen om dette. Du vil ikke bli tatt av noen behandling som du bruker nå.

Før du får noen behandling vil vi undersøke glukoseomsetningen i kroppen med en oral glukosebelastning. Du vil få 75g sukker oppløst i vann å drikke og det vil tas blodprøver ved start og i løpet av en 2 timers oppfølgingsperiode for analyse av blodsukker og insulin til denne undersøkelsen. Etter glukosebelastningen vil vi undersøke blodkarenes evne til å trekke seg sammen. Undersøkelsen gjøres ved hjelp av en svak laserstråle som gjennom huden måler de røde blodlegemenes hastighet. Laser-elektroder festes til huden med tape og blodårene stimuleres med et kroppsegent stoff (acetylcholin) ved hjelp av elektriske strømmer med så lav styrke at det ikke føles. Dette gjør at blodårene utvider seg. Mot slutten av undersøkelsen vil vi klemme av blodtilførselen til underarmen i tre minutter med en vanlig blodtrykksmansjett. Undersøkelsen er verken farlig eller spesielt ubehagelig (medfører ingen stikk), men du må ligge stille uten å prate under hele undersøkelsen, som til sammen tar ca 75 minutter. Disse to undersøkelsene vil repeteres etter hver av de to behandlingsperiodene.

Totalt vil det bli 7 ekstra besøk på Rikshospitalet, fire korte kontrollbesøk for å sikre at du ikke får noen farlige bivirkninger og tre lengre besøk der vi skal utføre de ulike undersøkelsene nevnt over (hvert av disse besøkene vil ta ca. fire timer).

Mulige fordeler, ulemper og alvorlige bivirkninger

Du vil sannsynligvis få bedre kontroll på blodsukret under denne aktive delen studien, noe som er positivt for din generelle helsetilstand. I tillegg vil du bidra til å øke kunnskapen om hvordan sitagliptin virker på nyretransplanterte pasienter, og denne kunnskapen kan på lengre sikt føre til en bedre og mer individualisert behandling av transplanterte pasienter. Ulempen ved å delta vil være at du i en periode ikke vil få optimal behandling for ditt høye blodsukker, men det er ikke skadelig i et lengre tidsperspektiv. Det vil også bli tatt noe ekstra blod og at du vil være nødt til å komme til Rikshospitalet noen ekstra undersøkelsesdager. Sitagliptin er generelt godt tolerert. Det er rapportert

bivirkninger og de vanligste bivirkningene registrert så langt er; kvalme, gasser i magen, forstoppelse, hodepine, svimmelhet, hypoglykemi og ødemer. Nye bivirkninger som enda ikke er beskrevet kan forekomme da dette er et relativt nylig godkjent legemiddel. Hvis du føler noe ubehag ved behandlingen må du melde fra til din studielege så fort som mulig. Hvis vi oppdager noe ved din helse under denne studien som krever videre oppfølging vil vi sørge for at du får det.

Hva skjer med prøvene og informasjonen om deg?

Prøvene tatt av deg og informasjonen som registreres om deg skal kun brukes slik som beskrevet i hensikten med studien. Alle opplysningene og prøvene vil bli behandlet uten navn og fødselsnummer eller andre direkte gjenkjennende opplysninger. En kode knytter deg til dine opplysninger og prøver gjennom en navneliste. Listen som kan koble ditt navn til koden vil kun bli oppbevart på Rikshospitalet og bare personell med ansvar for studien har tilgang til denne.

Dataene og prøvene dine vil lagres i 15 år etter at sluttrapport for studien er skrevet. Etter det vil dataene bli anonymisert og prøvene destruert. Tidspunktet for dette vil være avhengig av hvor lang tid det tar før studien er ferdig.

Det vil ikke være mulig å identifisere deg i resultatene av studien når disse publiseres.

Frivillig deltakelse

Det er frivillig å delta i studien. Du kan når som helst og uten å oppgi noen grunn trekke deg fra studien uten at det får konsekvenser for din videre behandling. Du undertegner samtykkeerklæringen dersom du ønsker å delta.

Har du spørsmål til studien, ta kontakt med Professor Trond Jenssen (23 07 19 07) eller Professor Anders Åsberg (22 85 65 59).

Ytterligere informasjon om biobank, personvern, økonomi og forsikring finnes i kapittel A – Personvern, biobank, økonomi og forsikring.

Samtykkeerklæring følger etter kapittel A. – *Signeres av både dem som samtykker til å delta i studien. Personen, som har informert om studien, kan bekrefte at informasjonen er gitt..*

Kapittel A - Personvern, biobank, økonomi og forsikring

Personvern

Opplysninger som registreres om deg er generelle helseopplysninger og din sykehistorie i tillegg til data fra analysene og blodprøvene tatt av deg under studien.

Representanter fra sponsor, Statens legemiddelverk og kontrollmyndigheter i inn- og utland kan få utlevert studieopplysninger og gis innsyn i relevante deler av din journal. Formålet er å kontrollere at studieopplysningene stemmer overens med tilsvarende opplysninger i din journal. Alle som får innsyn i informasjon om deg har taushetsplikt.

Forskningsbiobank

Blodprøvene som blir tatt og informasjonen utledet av dette materialet vil bli lagret i en forskningsbiobank. Prøver og resultater blir lagret i forskningsbiobanken som professor Anders Åsberg ved Farmasøytisk institutt er ansvarlig for. De oppbevares til 2025 før de blir destruert og slettet.

Innsynsrett og oppbevaring av materiale

Hvis du sier ja til å delta i studien, har du rett til å få innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg. Du har videre rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene vi har registrert. Dersom du trekker deg fra studien, vil det ikke samles inn flere opplysninger eller mer materiale. Opplysninger som allerede er innsamlet fra deg vil ikke bli slettet.

Finansiering

Studien og biobanken er finansiert av forskerne bak studien som jobber ved Universitetet i Oslo og ved Rikshospitalet. Det blir ikke utbetalt noen kompensasjon utover dirkede utlegg i forbindelse med studien til deltakere eller forskere.

Forsikring

Du er forsikret i henhold til Lov om produktansvar i Legemiddelforsikringen og i henhold til pasientskadeerstatningsordningen.

Informasjon om utfallet av studien

Du vil etter hvert kunne få informasjon om studiens resultater ved henvendelse til hovedansvarlig lege for denne studien, professor Trond Jenssen ved Nyreseksjonen, Rikshospitalet.

Samtykke for deltakelse i studien

Jeg er villig til å delta i studien

(Signert av prosjektdeltaker, dato)

Bekreftelse på at informasjon er gitt deltakeren i studien

Jeg bekrefter å ha gitt informasjon om studien

(Signert, rolle i studien, dato)

Skjema for hjemmemåling av blodsukker

Pasientnr.	
Initialer	

Dato	Morgen, fastende	2 t. etter frokost	2 t. etter lunsj	2 t. etter middag	2 t etter kveldsmat	Kommentar/ evt. tilleggsmåling

- Målingene skal foretas hver dag under studien.
- Ved mistanke om hypoglykemi; gjør nødvendige ekstra målinger, og før resultatene i kolonnen til høyre.
- Ferdig utfylt skjema leveres siste undersøkelsesdag.

Vedlegg

Oral glukosetoleranse test. Plasmaglukosekonsentrasjon oppgitt i mmol/L.

Pasient- nummer	B 0	B 30	B 120	K 0	K 30	K 120	S 0	S 30	S 120
1	6.4	9.8	8.7	7.0	12.2	7.7	6.2	10.1	2.5
2	7.8	14.4	18.9	8.8	13.9	17.0	8.7	12.3	18.8
3	6.4	8.6	7.5	5.1	7.9	6.7	5.4	7.5	5.6
4	5.4	11.4	8.4	5.9	9.8	9.6	5.1	9.7	9.1
6	8.3	13.1	17.3	8.0	13.5	16.4	7.1	11.9	9.7
7	9.6	*	*	8.0	*	*	7.3	*	*
8	9.7	*	*	11.2	*	*	7.6	*	*
10	6.0	10.4	13.1	8	10.8	15.7	5.1	9.0	10.5
11	7.9	8.9	10.9	10.4	8.9	8.9	6.5	9.6	8.8
12	6.3	12.1	13.6	7.0	10.2	14.3	7.7	10.8	11.4
13	7.6	13.4	17.8	8.3	17.7	20.6	9.5	13.9	20.1
14	5.7	7.8	11.5	5.1	8.1	15.7	3.8	9.0	9.3

B: baseline

K: kontrollperiode

S: sitagliptinbehandling

0: nullprøven

30: 30 minutter

120: 120 minutter

*ikke utført

Vedlegg

Oral glukosetoleranse test. C- peptid konsentrasjon oppgitt i nmol/L.

Pasientnummer	Baseline	Kontrollperiode	Sitagliptinbehandling
1	1.73	1.26	1.30
2	2.28	1.80	2.07
3	0.84	0.87	0.82
4	1.35	1.40	1.78
6	0.85	0.77	0.62
7	0.94	0.83	1.06
8	1.42	2.00	2.02
10	1.47	1.27	1.77
11	1.35	1.60	1.50
12	1.11	1.05	1.28
13	1.37	1.68	2.13
14	3.44	*	3.29

*mangler data

Vedlegg

Oral glukosetoleranse test. Insulinkonsentrasjon oppgitt i pmol/L.

Pasientnummer og undersøkelsesdag	0 t	30 minutter	120 minutter
1 Baseline	181.821675	*	*
1 Kontrollperiode	68.772375	628.80265	1232.3493
1 Sitagliptin- behandling	62.774075	375.187925	398.793675
2 Baseline	153.832	315.836325	869.100575
2 Kontrollperiode	205.972725	277.593575	759.165225
2 Sitagliptin- behandling	765.7734	216.0536	1258.358675
3 Baseline	116.5794	70.824425	180.085325
3 Kontrollperiode	43.057175	177.83955	208.369175
3 Sitagliptin- behandling	62.5086	154.556675	130.28365
4 Baseline	240.6782	1697.109925	837.788875
4 Kontrollperiode	149.7279	1549.3695	490.06685
4 Sitagliptin- behandling	221.17655	1568.1393	942.357325
6 Baseline	**	254.992325	533.1025
6 Kontrollperiode	**	130.6137	374.80765
6 Sitagliptin- behandling	**	145.315275	320.9521
7 Baseline	120.32475	*	*
7 Kontrollperiode	65.787575	*	*
7 Sitagliptin- behandling	97.687625	*	*
8 Baseline	144.683875	*	*
8 Kontrollperiode	231.4081	*	*
8 Sitagliptin- behandling	499.229325	*	*
10 Baseline	82.21115	223.6878	272.29125
10 Kontrollperiode	**	125.871025	239.795675
10 Sitagliptin- behandling	112.6475	151.715375	231.243075
11 Baseline	20.93665	195.497225	454.112925
11 Kontrollperiode	72.13745	330.66705	511.7497
11 Sitagliptin- behandling	55.2762	225.02235	275.656325
12 Baseline	83.96185	279.92545	386.2733
12 Kontrollperiode	72.445975	261.47135	225.65375
12 Sitagliptin- behandling	141.0031	396.47615	536.6326
13 Baseline	194.693625	334.649175	609.537775
13 Kontrollperiode	179.066475	333.056325	345.16055
13 Sitagliptin- behandling	214.740575	292.991125	604.7377
12 Baseline	442.65445	407.260175	449.549625
14 Kontrollperiode	*	*	*
14 Sitagliptin- behandling	347.14085	370.997725	433.219325

*data mangler

**insulinkonstrasjon lavere enn metodens deteksjonsgrense

Vedlegg

NO- konsentrasjon (µmol/L)

Kolonne1	Baseline	Kontrollperiode	Sitagliptinbehandling
1	43.378	43.039	33.905
2	101.56	32.217	52.509
3	51.495	47.437	44.055
4	60.292	43.716	52.512
6	41.348	43.039	37.289
7	56.906	38.980	69.763
8	56.613	97.833	63.336
10	43.378	45.746	28.494
11	31.540	52.258	36.954
12	46.759	44.73	40.335
13	25.113	18.687	25.112
14	191.500	*	84.308

*data mangler

Vedlegg

Laser Doppler, baseline resultater.

Pasientnummer	AUC _{ACh} (AUmin)	Peak _{ACh} (AU)	AUC _{rh} (AUmin)	Peak _{rh} (AU)
1	297.4	66.3	*	*
2	501.3	111	2.5	26.7
3	46.5	14.4	1.5	25.5
4	107.2	39.2	0.3	34.5
6	60.4	15.4	5.9	17.6
7	520.63	108.2	17.5	47.8
8	270.7	63.7	-1.9	28.5
10	**	**	**	**
11	-0.8	20.4	35.1	99.3
12	258.2	82.5	0.8	7.3
13	145.6	41.7	*	*
14	756.8	3.2	29.3	102.5

*ikke utført

**pasient ekskludert fra Laser Doppler undersøkelsen

Laser Doppler, resultater fra undersøkelsen etter kontrollperiode

Pasientnummer	AUC _{ACh} (AUmin)	Peak _{ACh} (AU)	AUC _{rh} (AUmin)	Peak _{rh} (AU)
1	495.19	101.6	-25.62	22.8
2	*	*	-1.985	30.1
3	489.4	144.1	-5.595333	20.9
4	35.491667	14.7	-0.918	71.3
6	110.296667	37.2	7.344	17.4
7	610.211667	109.6	42.781833	69.5
8	511.761667	106.8	82.944167	82.6
10	**	**	**	**
11	201.113333	88.7	28.509	53.3
12	28.636667	8.9	1.512833	9
13	309.366667	82.9	20.6875	54.9
14	481.745	114.2	-10.824833	41.4

*teknisk feil

**pasienten ekskludert fra Laser Doppler undersøkelsen

Laser Doppler, resultater fra undersøkelsen etter sitagliptinbehandling

Pasientnummer	AUC _{ACh} (AUmin)	Peak _{ACh} (AU)	AUC _{rh} (AUmin)	Peak _{rh} (AU)
1	748.2	144.9	97.7	95.7
2	521.6	99.0	-27.3	27.6
3	132.7	33.9	12.9	22.4
4	62.0	24.9	24.6	45.1
6	378.4	79.2	0.0	23.7
7	254.2	60.9	52.5	58.0
8	374.5	105.0	75.9	116.9
10	**	**	**	**
11	510.4	96.8	31.7	66.8
12	384.8	93.8	-5.0	10.0
13	32.6	7.1	-34.4	-38.8
14	141.1	28.8	-5.8	42.9

**pasienten ekskludert fra Laser Doppler undersøkelsen